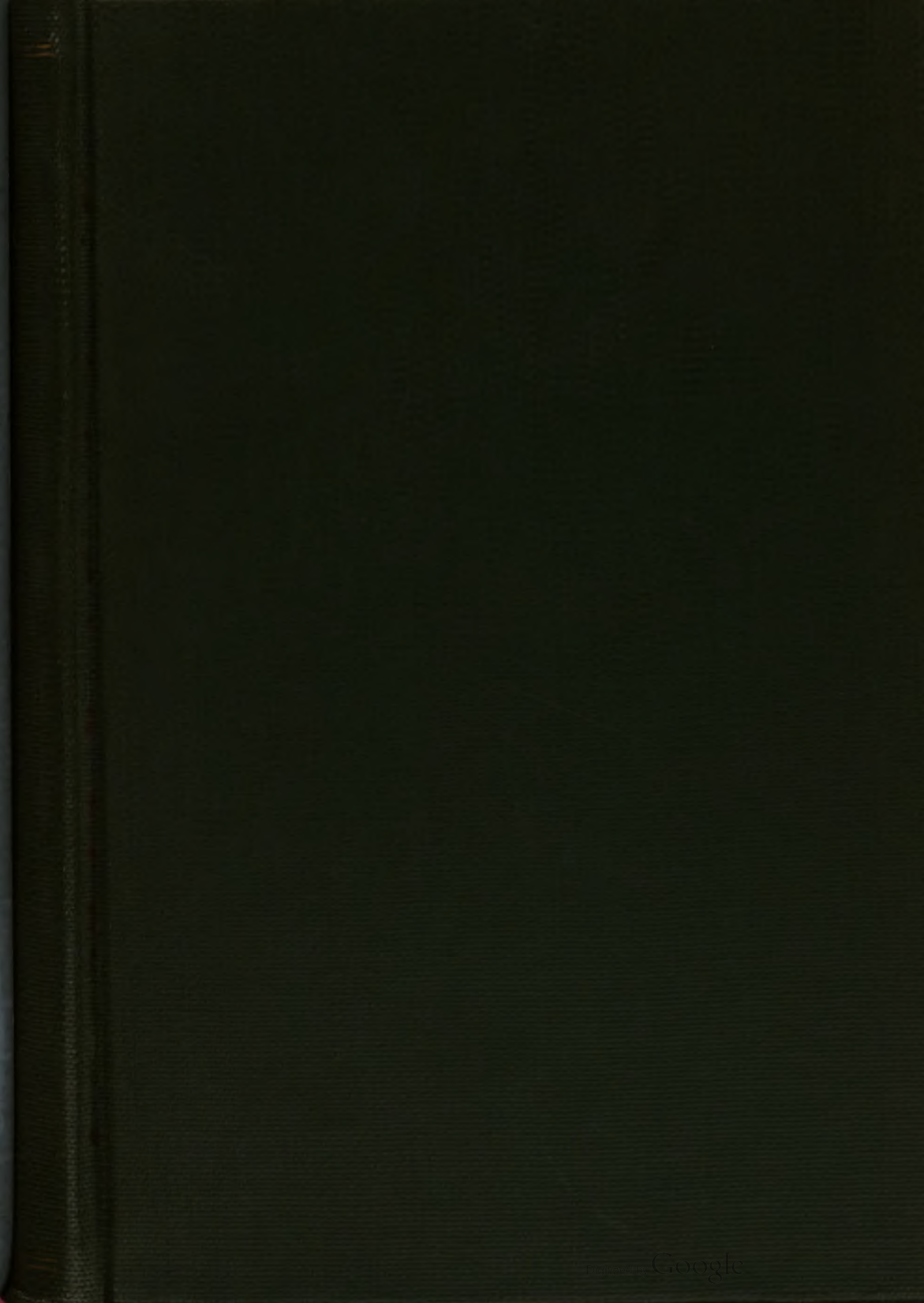
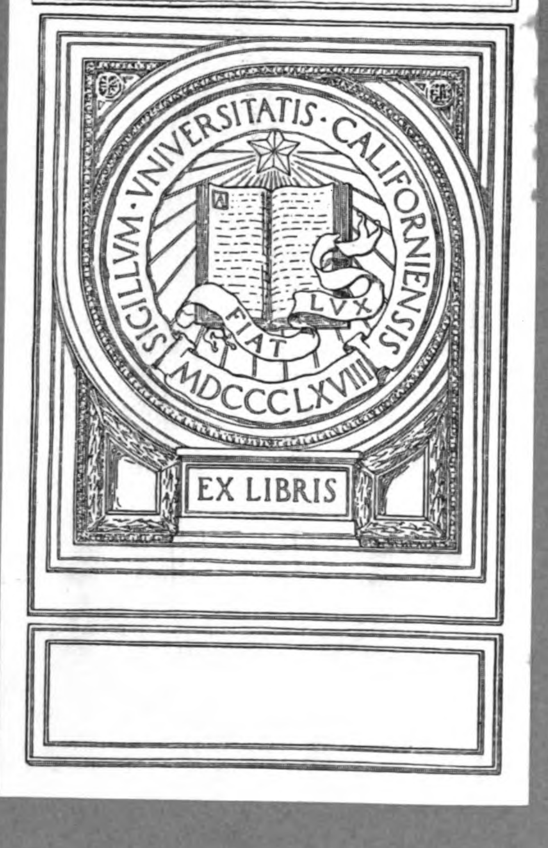



MEDICAL SCHOOL
LIBRARY


SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS



Biochemische Zeitschrift

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertvierundachtzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1927

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig

Inhalt.

Über Kalkausfällung durch Mikroorganismen.

Von

Carl Naeslund.

(Aus dem Bakteriologisch-Hygienischen Institut der Universität Upsala.)

(Eingegangen am 8. Februar 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Ausfällung von Kalk erfolgt im Körper oft im Anschluß an die Entwicklung von Mikroorganismen. Beim Versuch, die Ursache einer derartigen Kalkausfällung zu erklären, berücksichtigt man in der Regel nicht die Möglichkeit, daß die Mikroorganismen während ihres Wachstums die Löslichkeitsverhältnisse für den Kalk so verändern könnten, daß dieser dadurch ausfällt. Man nimmt vielmehr allgemein an, daß Kalkablagerung in den Vegetationen der Mikroorganismen, wie Actinomyceskörnern, Tuberkelbakterienanhäufungen, Leptothrixpfropfen in den Tonsillen oder dergleichen als eine auf rein physikalisch-chemischem Wege entstandene Kalkinkrustation von toten Mikroorganismen zustandekommt.

Für die Untersuchung der Rolle, welche die Mikroorganismen bei der Kalkausfällung im Körper spielen, besitzen gewisse kalkreiche Konkremente, die sich auf einem Stroma von Mikroorganismen bilden, großes Interesse. Besonders gilt dies von Speichelsteinen und vom Zahnstein. Es hat sich nämlich gezeigt, daß diese beiden Konkrementformen von mehr oder weniger stark ausgebildeten Actinomyces- oder Leptothrixvegetationen durchsetzt zu sein pflegen, und bei Züchtungsversuchen aus den Konkrementen erhielt man eine größere Anzahl Reinkulturen der genannten Mikroorganismen. Bei näherer Untersuchung der Verhältnisse, unter welchen diese Konkremente gebildet werden, hat es sich ferner herausgestellt, daß sie höchstwahrscheinlich als Folge des Wachstums der Mikroorganismen in Speichel oder Exsudat[1]) entstehen.

Eine andere Konkrementbildung, die gleichfalls mit der Entwicklung von Mikroorganismen in Zusammenhang zu stehen scheint, ist der Tränenstein. Eine nähere Untersuchung über die Entstehungsweise und die Ursache der Konkrementbildung in den Tränenwegen existiert allerdings

---

[1]) Siehe näheres darüber: *Naeslund*, Acta Path. et Microb. Scand. **2**, 244, 1925; **3**, 637, 1926.

nicht, dagegen finden sich in der Literatur mehrere Angaben, daß Actinomyces[1]) in derartigen Konkrementen gefunden oder aus ihnen gezüchtet wurden[2]).

Um die Kalkausfällung und die Konkrementbildung durch die Mikroorganismen im allgemeinen und die hierbei vor sich gehenden Prozesse näher zu studieren, habe ich folgende Versuche ausgeführt.

Eine Anzahl verschiedener Mikroorganismen wurde betreffs des Vermögens, bei Wachstum in kalkreichen Medien Kalk auszufällen, untersucht. Bei diesen Untersuchungen wurden verschiedene Medien geprüft, wobei gewöhnliche Peptonbouillon, mit einem so gut wie neutral reagierenden Kalksalz — Calciumchlorid — versetzt, zufriedenstellende und vergleichbare Resultate[3]) ergab.

Der Calciumchloridgehalt in der Bouillon betrug 0,5 bis 0,7 Proz. Die Wasserstoffionenkonzentration der Bouillon betrug 6,8 bis 7,1. Die Versuche wurden bei 37° C in Kolben ausgeführt, die gewöhnlich einen Fassungsraum von 100 ccm hatten. Sobald die ausgesäten Mikroorganismen anscheinend den Höhepunkt ihrer Entwicklung erreicht hatten, wurden die Kulturen und das Medium auf Vorhandensein von Kalk in fester Form untersucht und auch die Wasserstoffionenkonzentration bestimmt.

Versuche mit nachstehenden Mikroorganismen gaben ziemlich gleichartige und konstante Resultate.

Penicillium brevicaule sowie ein paar *Mucor*-Arten: Ursprüngliche $p_H = 7,0$. Nach einem Monat reichliche Kalkablagerung in den auf der Oberfläche wachsenden Kulturen. Ein paar Kulturen sind zu festen Platten verkalkt. Keine makroskopisch sichtbare Kalkausfällung in der Bouillon. $p_H = 7,6$ bis 7,9.

Actinomyces. Es wurden mehrere verschiedene Actinomycesstämme untersucht: Act. cornealis (*Löwenstein*), Act. asteroides (*Eppinger*), Strept.

---

[1]) Die Bezeichnung *Actinomyces* wird hier im Sinne der Bakterienklassifizierung angewendet, die von der „Society of American Bacteriologists" vorgeschlagen wurde, und umfaßt die langen, verzweigten Mikroorganismen, die in der Literatur unter dem Namen von Actinomyces, Streptothrix, Cladothrix, Nocardia, Oospora usw gehen.

[2]) Nähere Literatur darüber z. B. in: *C. Nagel*, Amer. Journ. Ophthalm. III, **3**, 327, 1920; *G. Robert*, Intern. Clin. **3**, 83, 1921; *Peemöller*, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. **50**, 523, 1922 (nur Literaturangaben).

[3]) Ohne Zweifel wäre es wünschenswert gewesen, die Versuche mit Kalk in der Form, wie er im menschlichen Körper gelöst vorkommt, auszuführen. Derartige Versuche sind indes sehr schwierig und zeitraubend, weil sie große Flüssigkeitsmengen, konstanten Kohlensäuregehalt und konstante Wasserstoffionenkonzentration erfordern. Versuche über Kalkausfällung in Speichel haben auch gezeigt, daß man im großen ganzen dieselben Resultate erhielt, ob der Kalk in natürlicher Weise gelöst im Speichel vorhanden war oder in Form von Calciumchlorid (siehe näheres darüber: *Naeslund*, Acta Path. et Microb. Scand. **2**, 244, 1925).

madurae (*Vincent*), Strept. buccalis (*Winslow*), Act. hominis (*Landsteiner*), aerobe und anaerobe aus aktinomykotischem Material vom Menschen reingezüchtete Stämme; aerobe, aus Speichel- und Zahnstein sowie aerobe aus Heu und Erde reingezüchtete Stämme. Ursprüngliche p_H = 6,9 bis 7. Nach ungefähr 2 Monaten war in sämtlichen Kulturen Kalk ausgefällt worden. Am stärksten war die Verkalkung der üppig wachsenden Stämme aus Speichel- und Zahnstein, Heu und Erde, ferner Strept. buccalis und Strept. madurae. In einem Teile der Fälle waren diese Kulturen zu harten Kalkplatten verwandelt worden. In der Bouillon makroskopisch keine Kalkausfällung. p_H = 7,6 bis 8,1. Von Act. cornealis und asteroides ergaben sich schwach verkalkte Kulturen, die bei leichter Berührung zu einer sandähnlichen Masse zerfielen. p_H-Wert = 7,3 bis 7,7. Die anaeroben Actinomycesstämme entwickelten sich schlecht und zeigten nur eine sehr unbedeutende Kalkausfällung. p_H = 7,2 bis 7,3.

Tuberkelbazillen (bovine). Ursprüngliche p_H = 7,0. Nach 4 Wochen deutliche Kalkausfällung in den Kulturen, die bei Berührung in kleine, mehr oder weniger stark kalkinkrustierte Bruchstücke zerfielen; p_H = 7,6.

Timotheebazillen. Ursprüngliche p_H = 6,9 bis 7,1. Nach ungefähr einem Monat waren die auf der Oberfläche wachsenden Kulturen stark verkalkt, zu dünnen, spröden Platten; p_H = 7,9.

Smegmabazillen. Ursprüngliche p_H = 6,9. Nach ungefähr einem Monat enthalten die Kulturen einen ziemlich starken Kalkniederschlag, der bei leichter Berührung zu einer sandähnlichen Masse mit vereinzelten kleinen, festen Kalkschollen zerfällt; p_H = 7,8.

Butterbazillen. Ursprüngliche p_H = 7,1. Nach ungefähr einem Monat dasselbe Verhalten wie bei den vorhergehenden.

B. subtilis. Ursprüngliche p_H = 6,9. Nach einer Woche deutliche Ausfällung von Kalk in den Kulturen, so daß diese dünne, spröde, leicht zerfallende Häutchen auf der Substratoberfläche bilden; p_H = 7,7.

B. anthracis. Ursprüngliche p_H = 6,9. Nach einer Woche unbedeutende Ausfällung von Kalk; p_H = 7,3.

Microc. pyogenes aureus. Ursprüngliche p_H = 7,1. Nach einer Woche sehr geringe Kalkausfällung; p_H = 7,4.

B. typhi. Ursprüngliche p_H = 7,0. Nach einer Woche im großen und ganzen dasselbe Verhalten wie beim vorhergehenden.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß eine Anzahl Mikroorganismen das Vermögen besitzt, während ihres Wachstums in kalkreichen Medien Kalk in fester Form auszufällen. Diese Kalkausfällung scheint so gut wie immer mit einer Verringerung der Wasserstoffionenkonzentration im Zusammenhang zu stehen; oft so, daß die Ausfällung um so stärker wird, je höher der p_H-Wert steigt. Ferner findet man, daß diejenigen Mikroorganismen, die in dichten, zusammenhängenden Verbänden wachsen, wie Schimmelpilze, gewisse Actinomyces und zu einem gewissen Grade auch die Timotheebazillen leicht zu einheitlichen, festen Kalkstücken verkalkt werden, während diejenigen Mikroorganismen, die sich zu lose zusammengefügten Kolonien entwickeln, wie es scheint, nicht das Vermögen besitzen, die ausgefällten Kalk-

1*

partikel zu größeren und festeren Kalkstücken zu binden. Hierher dürften die meisten Bakterien gehören.

Diese Beobachtungen erklären in einer anscheinend zufriedenstellenden Weise, weshalb speziell die fadenförmigen Mikroorganismen [wie Actinomyces[1]) und Leptothrix] leicht verkalkt werden und Veranlassung zu Konkrementbildung im Körper geben können, und weshalb diese Mikroorganismen vor anderen Mundbakterien den organischen Grundstock für Speichelsteine und Zahnstein bilden.

Für die Entstehung der Kalkausfällung durch Mikroorganismen ist die Zusammensetzung des kalkhaltigen Mediums von großer Bedeutung. So kann ein Zusatz von löslichem Phosphat in kleinen Mengen eine raschere und stärkere Kalkausfällung hervorrufen, während Zusatz einer Zuckerart, die von den Mikroorganismen gespalten wird, die Kalkausfällung hemmt. In der Regel sind sowohl die gewöhnlichen flüssigen, bakteriologischen Nährsubstrate als die Körperflüssigkeiten (wie Ascites, Blutserum und Speichel) geeignete Medien für Ausfällung von Kalk in fester Form durch Mikroorganismen. Kleine Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung dieser Medien können indes leicht die Möglichkeiten für die Entstehung von Kalkausfällung und Konkrementbildung verändern.

Bei so gut wie allen Versuchen zeigten sich die auf der Substratoberfläche wachsenden Kulturen bedeutend stärker kalkinkrustiert als diejenigen in der Tiefe. In mehreren Fällen konnten die oberflächlichen Kulturen stark verkalkt sein und reich an Calciumcarbonat, während die am Boden des Gefäßes wachsenden Kolonien keinen deutlichen Kalkniederschlag oder nur eine geringe Menge ungelösten Calciumphosphats aufwiesen. Es liegt nahe anzunehmen, daß die Ursache dieses Verhaltens in einem Einfluß der atmosphärischen Kohlensäure auf die Entstehung der Kalkausfällung in den oberflächlichen Kolonien zu suchen ist.

Um diese Frage zu untersuchen, wurden Versuche mit einigen stark wachsenden und kalkausfällenden Actinomycesstämmen, sowie mit einem Stamm von Penicillium brevicaule angestellt, die ich auf calciumchloridhaltiger Ascitesbouillon ($p_H = 7{,}1$) entweder unter einer Schicht von flüssigem Paraffin[2]) oder im kohlensäurefrei gemachten Raume wachsen ließ. Zum Vergleich wurden ähnliche Züchtungsversuche in gewöhnlicher Weise bei freiem Luftzutritt gemacht.

Die Versuche in der kohlensäurefreien Atmosphäre wurden so ausgeführt, daß man die mit Actinomyces besäten Kolben in ein großes Glasgefäß mit

---

[1]) Siehe Anm. 1, S. 2.

[2]) Eine Schicht flüssigen Paraffins verhindert nur bis zu einem gewissen Grade das Eindringen der Luftgase zu den darunter wachsenden Mikroorganismen.

dicht schließendem Deckel brachte, durch welchen zwei Röhrchen führten. Gleichzeitig ließ man ungefähr 200 ccm Kaliumhydratlösung (10 Teile KOH und 6 Teile H_2O) auf den Boden dieser Glasgefäße hinabrinnen. Nach Aufsetzen des Deckels wurde während einiger Minuten Luft, die in Waschflaschen von Kohlensäure befreit worden war, durch das Glasgefäß gesogen.

Dieses Durchsaugen von kohlensäurefreier Atmosphäre wurde dann jede Woche wiederholt.

Nach 2 Monaten wurden die verschiedenen Kulturen auf das Vorhandensein von ausgefälltem Kalk untersucht. Hierbei zeigte sich, daß in allen drei Versuchsserien eine sehr starke Entwicklung der Actinomyceskulturen erfolgt war. Die Kulturen, die bei freiem Luftzutritt gewachsen waren, hatten sich so stark verkalkt, daß sie feste Kalkplatten bildeten; bei den in kohlensäurefreier Atmosphäre und unter der Paraffinschicht entwickelten Kulturen war die Kalkausfällung nicht so stark ausgeprägt, aber doch augenfällig. In diesen letztgenannten Kulturen hatte sich Kalk in Form von mehr oder weniger großen Kalkschollen und sandähnlichem Kalkgrieß abgelagert, der teilweise aus Calciumcarbonat bestand. Am schwächsten war die Kalkausfällung bei den Züchtungsversuchen unter dem Paraffin, aber die Kulturen waren in dieser Versuchsserie in der Regel nicht so stark entwickelt, wie bei den zwei anderen. In sämtlichen Versuchen war die Bouillon völlig klar, ohne sichtbare Kalkausfällungen. Die Wasserstoffionenkonzentration hatte nach Beendigung der Versuche in den Kulturen, die sich in freier Luft und in kohlensäurefreier Atmosphäre entwickelt hatten, einen p_H-Wert von 7,6 bis 8,2 erreicht, während die entsprechenden p_H-Werte der unter der Paraffinschicht entwickelten Kulturen 7,3 bis 7,5 betrugen.

Aus diesen Versuchen scheint also hervorzugehen, daß die Kalkausfällung durch Mikroorganismen rascher und kräftiger geschieht, wenn der Prozeß unter gleichzeitiger Einwirkung des Kohlendioxyds der Luft vor sich gehen kann.

Bei den hier angeführten Untersuchungen ist es unmöglich, festzustellen, inwiefern die Kalkausfällung in den Kulturen eine Folge der biochemischen Prozesse ist, welche durch die wachsenden Mikroorganismen hervorgerufen werden, oder ob es sich nur um eine auf rein physikalisch-chemischem Wege entstandene Kalkinkrustierung von toten Mikroorganismen handelt. Um die Verhältnisse, unter welchen Kalkausfällung und Verkalkung von Kulturen entstehen können, zu untersuchen, sind deshalb folgende Versuche ausgeführt worden.

Kulturen von Tuberkelbazillen, Actinomyces- und Timotheebazillen, die 1 bis 2 Monate auf gewöhnlicher Bouillon gewachsen waren, wurden durch ½stündige Erwärmung auf 90° getötet und auf sterile Bouillon überführt, die 0,7 Proz. Calciumchlorid enthielt. Mit Hilfe von kleinen Paraffinplatten hielt man die Kulturen in gleicher Weise wie wachsende Oberflächenkulturen auf der Substratoberfläche schwimmend. Nach zweimonatiger Verwahrung im Thermostaten konnte in den Kulturen keine Kalkausfällung konstatiert werden.

Ein anderer Versuch wurde derart ausgeführt, daß eine abgetötete Kultur auf die Oberfläche von calciumchloridhaltiger Bouillon gebracht

und gleichzeitig der letztere mit lebendem Material von demselben Stamme besät wurde. Nach einigen Wochen Verwahrung bei 37° waren die ausgesäten Kulturen über die Substratoberfläche ausgewachsen und nach einigen weiteren Wochen waren die lebenden Kulturen in die toten hineingewachsen und hatten sie ein Stück weit infiltriert. Bei der Untersuchung zeigte sich, daß Kalksalze in der Kultur, die wuchs, und in dem Teil der toten Kultur ausgefallen waren, der mit lebenden Actinomyces-Vegetationen infiltriert war, während der übrige Teil der toten Kulturen frei von Kalk in fester Form war.

Ein ähnlicher Versuch mit Schimmel ergab dasselbe Resultat.

Bei der Beurteilung der Rolle, welche die lebenden Mikroorganismen bei der Entstehung von Kalkkonkrementen spielen, ist auch die Kenntnis der Lokalisation der Kalkausfällung in verkalkten Kulturen von Bedeutung.

Eine Anzahl von Kulturen in verschiedenen Stadien von Verkalkung wurden nach Celloidineinbettung und Schneiden mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich dabei, daß die Kalkausfällung gewöhnlich in dem Teil der

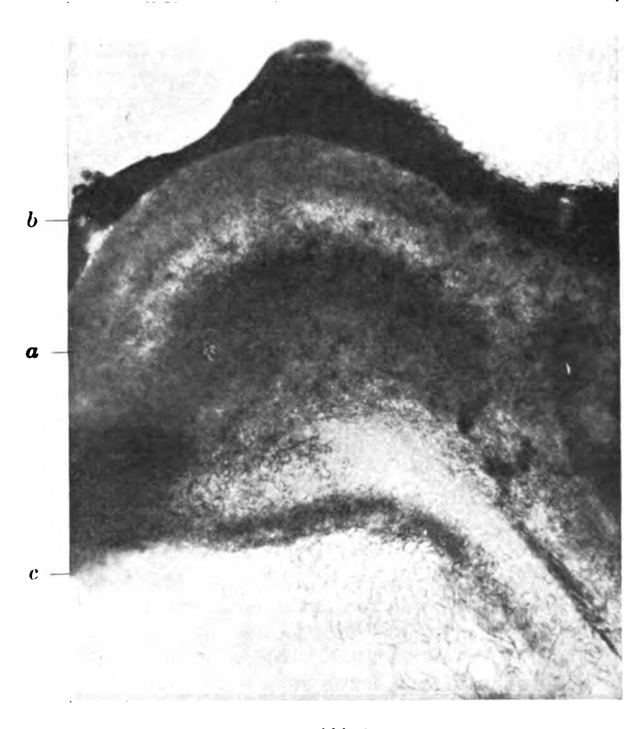


Abb. 1.

Querschnitt durch Actinomyces-Kultur aus kalkhaltigem Speichel mit beginnender Verkalkung. *a* = verkalkte Schicht, *b* = obere Fläche der Kultur, *c* = untere Fläche der Kultur. Entkalkung mit Trichloressigsäure. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin. Mikrophotographie. 90 malige Vergrößerung.

Kultur beginnt, in dem man das schnellste Wachstum und den raschesten Stoffwechsel vermuten muß. Bei den aerob wachsenden Kulturen findet man somit den Beginn der Kalkausfällung ein Stück unter der oberen Kulturfläche. Die Kalksalze fallen zuerst in den am kräftigsten gefärbten Teilen des Mycels in Form von größeren oder kleineren Körnern aus, die sich nach und nach vergrößern und zu großen einheitlichen Kalkstücken zusammenwachsen (s. Abb. 1).

Bei Züchtungsversuchen aus zentralen Teilen von alten, vollständig verkalkten Kulturen wuchsen gewöhnlich große Mengen Kolonien auf Agar.

Die Resultate sämtlicher Versuche sprechen also dafür, daß Ausfällung von Kalk in Kulturen von Mikroorganismen, die in kalkhaltigen Medien unter Verhältnissen, wie sie bei den hier ausgeführten Versuchen vorlagen, wachsen, eine Folge der biochemischen Prozesse ist, welche durch die Mikroorganismen während ihrer Entwicklung hervorgerufen werden, sowie daß die Ablagerung von Kalk in den Kulturen vor sich geht, während die Mikroorganismen noch am Leben sind. Es scheint auch, als ob resistentere Mikroorganismen in vollständig verkalkten Kulturen in größerem Ausmaß relativ lange Zeit leben bleiben.

Was die Natur der biochemischen Prozesse, die die Kalkausfällung verursachen, betrifft, so dürfte die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration der wichtigste Faktor sein. In sämtlichen Versuchen, in denen Kalkausfällung vorgekommen ist, wurde immer eine bedeutende Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration beobachtet. Wird dagegen die Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration z. B. durch Zusatz von gärungsfähigen Zuckerarten verhindert, so entsteht keine deutliche Kalkausfällung (sofern nicht der ganze Zucker hatte vergären können und die Wasserstoffionenkonzentration begonnen hatte zu sinken), trotzdem sich die Mikroorganismen ebenso kräftig entwickeln wie auf zuckerfreien Medien. Um den Zusammenhang zwischen Kalkausfällung und Wasserstoffionenkonzentrationsveränderung weiter zu studieren, wurden folgende Versuche ausgeführt.

Gewöhnliche Nährbouillon (800 ccm mit p_H 7,2) wurde mit Actinomycesstämmen aus Speichelsteinen besät. Nach einmonatigem, üppigem Wachstum auf der Substratoberfläche bei 37° wurde die Bouillon in einen anderen Kolben gegossen, während die Actinomyces-Kultur im ersten Kolben verblieb.

Zu 600 ccm der Bouillon, deren p_H-Wert nun 8,4 war, wurden 4 g Calciumchlorid in 200 ccm destillierten Wassers gelöst hinzugesetzt. Dabei fand unmittelbar eine Ausfällung von Kalksalzen statt. In die Bouillon mit dem ausgefällten Kalk wurde während einiger Stunden CO_2 eingeleitet. Dabei lösten sich die Kalksalze nach und nach vollständig in der Bouillon. Als sich praktisch keine ungelösten Kalksalze mehr in der Bouillon befanden, wurde die CO_2-Behandlung abgebrochen. Der p_H-Wert wurde bestimmt und mit 6,5 festgestellt. In den Kolben wurden zwei Stücke dicken Filtrierpapiers eingeführt, deren eines zu Boden sinken durfte, während das andere an Fäden aufgehängt wurde, die es in der Bouillonoberfläche schwebend erhielten. Sämtliche Prozeduren wurden so steril als möglich ausgeführt.

Mit einem Wattepfropfen in der Mündung wurde der Kolben dann in + 8° C gebracht, um die Entwicklung eventuell eingedrungener Bakterien zu verhindern und das Entweichen des Kohlendioxyds aus der Lösung zu verzögern.

Nach 3 Tagen begann die Bouillon, sich durch ausgefällte Kalksalze leicht zu trüben und mit einer dünnen Oberflächenhaut derartiger Salze zu belegen. Bakterienwachstum konnte nicht konstatiert werden. Der p_H-Wert war dabei auf 7,5 gestiegen. Als der Versuch nach weiteren 4 Tagen abgebrochen wurde, zeigte die Bouillon keine deutlich vermehrte Trübung, dagegen hatte sich der p_H-Wert zu 7,9 verändert. Bei der Untersuchung der Filtrierpapierstücke zeigte es sich, daß das in der Oberfläche der Bouillon aufgehängte Filtrierpapier infolge einer reichlichen Ausfällung von Kalksalzen eine ziemlich harte und feste Konsistenz besaß, während das andere Stück, das auf dem Boden gelegen war, weich und nicht verkalkt war. Die Ausfällung von Kalksalzen in diesem Versuch muß so gut wie ausschließlich auf dem Sinken der Wasserstoffionenkonzentration beruhen, die durch das Entweichen von Kohlensäure in die Luft hervorgerufen wurde. Die Kohlensäure entwich an der Oberfläche, wodurch die Wasserstoffionenkonzentration an der Oberfläche der Bouillon stärkstens reduziert wurde. Dabei entstand in dem Filtrierpapier, das in der Flüssigkeitsoberfläche aufgehängt war, eine frühzeitigere und stärkere Ausfällung von Kalksalzen als in dem, das auf dem Boden lag.

Eine gute Komplettierung dieses Versuchs lieferte der Versuch mit den ursprünglichen Actinomyces-Kulturen, von denen die oben genannte Bouillon herstammte. Nach der Entfernung der Bouillon wurde das Kulturhäutchen in zwei Hälften geteilt, worauf 600 ccm steriler, gewöhnlicher, frischer Bouillon, mit 0,7 Proz. Calciumchlorid versetzt und mit einem p_H-Wert von 7,2 so in den Kolben gegossen wurde, daß die beiden Kulturstücke auf die Oberfläche zu schwimmen kamen. Um eigentliches Wachstum und die damit verbundenen biochemischen Prozesse innerhalb der Actinomyceskulturen zu verhindern, wurden 0,3proz. Carbolsäure zugesetzt. Dieser Säurezusatz änderte die Wasserstoffionenkonzentration nicht, da Carbolsäure praktisch so gut wie nicht ionisiert ist.

Mit Hilfe einer speziellen Anordnung wurde n/30 Natriumhydratlösung tropfenweise auf die obere Fläche der einen Kultur gebracht. Man ließ die Hydratlösung während der ganzen Versuchszeit kontinuierlich langsam tropfen. Nach 22 Tagen, als der Versuch abgebrochen wurde, war der p_H-Wert der Bouillon 8,6. Von den beiden Kulturstücken war das alkalisierte stark verkalkt, während das andere Stück, das daneben lag, aber von seiten des Natriumhydrats keinen direkten Einfluß erfahren hatte, von ausgefällten Kalksalzen in makroskopisch wahrnehmbarer Menge frei war. Die verkalkten Kulturen zeigten im Schnitt nach Einbettung und Entkalkung ungefähr dasselbe histologische Bild wie die oben beschriebenen Kulturen, die während des fortschreitenden Wachstums spontan verkalkt waren.

Bei diesen Versuchen erhielt man also Konkrementbildung durch direkten Zusatz von Alkali in solcher Menge, daß die Wasserstoffionenkonzentration auf dieselben Werte herabsank, wie bei Konkrementbildung in wachsenden Kulturen.

Die Ursache dafür, daß gewisse Mikroorganismen bei ihrem Wachstum eine Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration hervorrufen,

dürfte wohl in ihrer proteolytischen Wirksamkeit zu suchen sein. Diejenigen Mikroorganismen, die eine starke Steigerung des p_H-Wertes hervorrufen, weisen oft auch stark ausgeprägte proteolytische Eigenschaften auf.

Ergebnis.

Verfasser hat versucht zu zeigen, daß Kalkausfällung und Konkrementbildung in Kulturen von lebenden Mikroorganismen als Folge der biochemischen Prozesse entstehen können, welche im Zusammenhang mit dem Wachstum der Mikroorganismen vor sich gehen. Hierbei dürfte die Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration der wichtigste Faktor sein.

Bestimmung kleinster Mengen von l-β-3,4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure und Tyrosin nebeneinander[1]).

Von

Hans Schmalfuss und Heinrich Lindemann.

(Aus dem Chemischen Staatsinstitut der Universität Hamburg.)

(Eingegangen am 8. Februar 1927.)

Für die Lehre von den tierischen und pflanzlichen Melaninen[2]) gewinnt die l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure (= D)[3]) neben dem Tyrosin ständig an Bedeutung. Vor allem läßt sich die Kinetik der fermentativen Melaninbildung mit Hilfe dieser Aminosäuren gut studieren. In konzentrierteren Lösungen flockt das Melanin leicht aus, und es entsteht so ein grobdisperses System mit veränderten Eigenschaften. Deshalb ist es für viele Fälle erwünscht, nur Lösungen von m/2000 an abwärts zu verwenden.

Für Messungen so geringer Konzentrationen gefärbter Lösungen ist die Kolorimetrie[4]) die gegebene Methode, doch mußten die Grundlagen hier erst sorgfältig geprüft werden, da über die Art und Anzahl der jeweils gebildeten Stoffe bisher nichts Sicheres bekannt ist, und Dispersitätsänderungen in der kolloidalen Lösung eine Rolle spielen könnten.

Von den Chromogenen, die wir in unseren bisherigen Arbeiten[1]) untersuchten, läßt sich nur das D in annähernd neutraler Lösung

---

[1]) Studien über die Bildung von Pigmenten III. Fermentativer Mikronachweis von l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure neben Tyrosin. Fermentforschung 8, 423, 1925.

[2]) Melanin ist als Sammelbegriff für die braunen bis schwarzen Farbstoffe gebraucht, die aus Phenolabkömmlingen durch Oxydation entstehen. Über Einheitlichkeit und Konstitution sagt dieser Begriff nichts aus.

[3]) Die l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure wird in dieser Arbeit abgekürzt mit D bezeichnet. Die Aminosäure wurde von den Chemischen Werken Grenzach A.-G., Grenzach in Baden, bezogen.

[4]) Im Gegensatz zu *Bach* und *Maryanovitsch*, diese Zeitschr. **42**, **417**, **1912**, geben wir alle Faktoren der Melaninbildung in absoluten Maßen an und vermeiden es, ein Ferment wechselnder Reinheit als Bezugsgröße zu verwenden.



schnell und quantitativ in Melanin[1]) überführen, ohne daß dieses Melanin ausflockt. Wenn überhaupt, so müßte es mit Hilfe des D daher möglich sein, zu einer brauchbaren Vergleichsgröße zu kommen. Deshalb legten wir das D der weiteren Untersuchung zugrunde.

1. Quantitative Umwandlung von D in Melanin.

Versuch. Wir ließen 100 ccm einer m/10000 D-Lösung[2]) bei Gegenwart von etwa 150 ccm Luft verschlossen 24 Stunden lang bei 38° im Brutschrank stehen. Dann war das D quantitativ in Melanin umgewandelt. Denn weitere Behandlung mit Sauerstoff änderte weder Farbton noch Farbtiefe der entstandenen Melaninlösung. Auch ließ sich mit Hilfe der empfindlichen Prüfstreifenmethode[3]) in der Reaktionslösung kein D mehr nachweisen.

2. Kolorimetrische Bestimmung des gebildeten D-Melanins.

a) *Quantitative Abhängigkeit des Farbtons und der Farbtiefe von der Melaninkonzentration und dem Dispersitätsgrad.* Wenn sich das Melanin aus D bildet, treten zwischen Farblos und Schwarz nacheinander folgende Farbtöne auf: Rosa, Gelblichbraun, Rötlichbraun, Braungrau und Blaugrau. *H. Haehn*[4]) versuchte, derartige Änderungen im Farbton von Melaninlösungen *ausschließlich* durch Änderungen im Dispersitätsgrad zu erklären. Gewiß kann der Dispersitätsgrad eine Rolle spielen. Z. B. weicht der rötliche Farbton einem gelblichen, wenn in alten Lösungen das Melanin auszuflocken beginnt. Farbtonwechsel kann aber auch bei gleichbleibendem Dispersitätsgrad auftreten. Denn betrachtet man zunehmende Schichthöhen einer Pigmentlösung von bestimmtem Dispersitätsgrad, so wird die gleiche Farbtonleiter durchlaufen wie bei der Bildung von Pigment.

Dieser Farbtonwechsel erschwert die Kolorimetrie nur wenig. Denn wenn die scheinbaren Helligkeiten gleich sind, sind auch die Farbtöne nahezu gleich.

Gewiß könnte man mit monochromatischem Lichte arbeiten[5]). Es ist jedoch einfacher und genügend genau, auf gleiche scheinbare Helligkeiten einzustellen, ohne die dann geringen Unterschiede im Farbton zu berücksichtigen.

---

[1]) Die quantitative Oxydation des D gelang *Bloch* und *Schaaf* bei der $[H^{\cdot}] = 6{,}3 \cdot 10^{-8}$ nicht. Diese Zeitschr. **162**, 198, 1925.

[2]) Gepufferte Lösung. Zusammensetzung des Puffers: 12 ccm m/3 NaH_2PO_4, 200 ccm m/3 Na_2HPO_4 und 1788 ccm Wasser. $[H^{\cdot}] = 0{,}12 \cdot 10^{-8}$. Wir führten die Messungen der $[H^{\cdot}]$ mit Apparaten aus, die uns von der Notgemeinschaft Deutscher Wissenschaft zur Verfügung gestellt waren. Für die Überlassung der Apparate danken wir auch an dieser Stelle.

[3]) *H. Schmalfuss* und *H. Werner*, Fermentforschung **8**, 116, 1924.

[4]) Diese Zeitschr. **105**, 189, 1920.

[5]) *v. Fürth* und *Jerusalem*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **10**, 149, 1907.

b) *Der Ablesefehler.* Bei günstigen scheinbaren Helligkeiten ist der Ablesefehler sehr gering.

Versuch. Wir füllten beide Kolorimetergefäße eines Ablaufkolorimeters nach *Wolff*[1]) mit einer quantitativ oxydierten m/10000 D-Lösung. Die dunkelbraune kolloidale Lösung war noch in einer Schichthöhe von 60 mm durchsichtig. Wir stellten bei wechselnden Schichthöhen auf gleiche scheinbare Helligkeit ein und lasen folgende Werte[2]) in Kolorimeterteilstrichen ab:

Links	Rechts	Ablesefehler
41 Teilstriche	41 Teilstriche	—
37 „	37,5 „	1,3 Proz.
30 „	30 „	—

Bei größeren Melaninkonzentrationen wird der prozentuale Fehler bei dem gleichen Ablesefehler größer, weil die Schichthöhen kleiner gewählt werden müssen. Denn größere Schichthöhen sind für den Vergleich zu dunkel.

Versuch. Eine erschöpfend oxydierte m/3000 D-Lösung ergab beim Vergleich im Kolorimeter folgende Werte:

Links	Rechts	Ablesefehler
26 Teilstriche	28 Teilstriche	8 Proz., Schichthöhe also zu hoch!
20 „	20 „	—
11,5 „	11,5 „	—

Ergebnis. Der Ablesefehler beträgt 0,5 bis 3 Proz. Bei einiger Übung geht er aber über 1 Proz. nicht hinaus.

c) *Die Reproduzierbarkeit bestimmter scheinbarer Helligkeiten.* Die kolorimetrische Methode ist nur dann brauchbar, wenn bestimmte scheinbare Helligkeiten reproduziert werden können. Mehrere Versuche zeigten uns, daß D-Lösungen geeigneter Konzentration bei erschöpfender Oxydation stets die gleichen scheinbaren Helligkeiten annehmen, selbst wenn die Temperatur- oder Druckverhältnisse ein wenig schwanken. Auch können die Lösungen zu verschiedenen Zeiten angesetzt werden. Schließlich ist es sogar *gleichgültig, ob die Oxydation fermentativ oder spontan verläuft*, ob Luft hindurch geleitet wird oder nicht. Dies spricht dafür, daß die *gebildeten Produkte gleich sind.* Für die Melanindarstellung und -untersuchung dürfte dies Ergebnis eine bedeutende Abkürzung bringen können.

---

[1]) *Stähler*, Arbeitsmethoden 2, 629. 1919. Leider stand uns kein moderner Apparat zur Verfügung.

[2]) Wir arbeiteten stets in diffusem, weißem Lichte.

Als Beispiel diene folgender Versuch: Zwei Melaninlösungen wurden aus m/10000 gepufferter[1]) D-Lösung bei der [H˙] = 6,3 . 10^{-9} hergestellt. Durch die erste Lösung war bei 18⁰ 5 Stunden lang Luft hindurch geleitet worden. Die zweite Lösung hatte 24 Stunden bei 38⁰ im Brutschrank gestanden. Beim Vergleich war die erste Lösung 7 Tage, die zweite 2,5 Tage alt. Wir lasen folgende Werte ab:

Erste Lösung (7 Tage alt. Bei 18⁰, durchlüftet)	Zweite Lösung (5 Tage alt. Bei 38⁰, nicht durchluftet)	Ablesefehler
87 Teilstriche	87 Teilstriche	—
80 „	79,5 „	0,6 Proz.
67 „	66,5 „	0,7 „
60 „	60 „	—
53 „	52,5 „	1 „

d) *Die Vergleichslösung.* Es empfiehlt sich, die Konzentration der Vergleichslösung ähnlich derjenigen der zu messenden Lösung zu wählen. Wir verwandten z. B. folgende Vergleichslösung: 100 ccm einer m/10000 D-Lösung in Puffer[1]) der [H˙] = 2 . 10^{-8} bis 5 . 10^{-9} werden in einer Flasche, die 250 ccm faßt, 24 Stunden lang im Brutschrank auf einer Temperatur von 38⁰ gehalten.

Die Lösung kann auch statt dessen 6 Stunden lang bei 40⁰ durchlüftet werden. Nach dieser Zeit ist das D quantitativ in Melanin umgewandelt worden. Diese Lösung bleibt meist über eine Woche lang brauchbar. Doch beobachteten wir, daß das Melanin bisweilen schon nach 4 Tagen auszuflocken beginnt. Lösungen, aus denen Melanin ausgeflockt ist, können durch Schütteln nicht immer wieder vergleichsfähig gemacht werden. Deshalb erneuern wir die Vergleichslösung jeweils nach 3 Tagen.

e) *Der Meßbereich.* Der Meßbereich der kolorimetrischen Methode erstreckt sich etwa von m/2000 bis m/333000 D-Lösungen. Am besten lassen sich Konzentrationen zwischen m/3000 und m/30000 D bestimmen. Verdünntere Lösungen als m/333000 sind zu wenig gefärbt, als daß man sie im Kolorimeter nach *Wolff* noch bestimmen könnte. Doch lassen sie sich unter Minderdruck bei tiefer Temperatur konzentrieren. Lösungen größerer Konzentration als m/2000 sind für die Kolorimetrie zu dunkel. Deshalb untersuchten wir, ob sich das Melanin

[1]) Zwei geeignete Pufferzusammensetzungen geben wir nach *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, Berlin 1914, S. 188, und *Kolthoff*, Die Farbindikatoren, Berlin 1921, S. 74, an: a) Phosphatpuffer ([H˙] = etwa 0,12 . 10^{-8}) 12 ccm m/3 NaH_2PO_4 + 200 ccm m/3 Na_2HPO_4 + 1788 ccm Wasser; b) Boratpuffer ([H˙] = 7,7 . 10^{-9}) 5,9 ccm n/5 NaOH + 50 ccm m/5 H_3BO_3 + m/5 KCl + 144,1 ccm Wasser.

chemisch oder physikalisch wesentlich verändert, wenn man die Lösungen verdünnt[1]).

Versuch. Wir verglichen zuerst die unverdünnte, dann die verdünnte Lösung mit einer Vergleichslösung mittlerer Konzentration. Wir lasen folgende Werte ab:

Vergleichslösung	Unverdünnte Lösung	Verhältniszahl	Vergleichslösung	10fach verdünnte Lösung	Verhältniszahl
48 Teilstriche	18,6 Teilstr.	2,85	27,2 Teilstr.	91 Teilstr.	2,99
43 „	14,7 „	2,92	22,8 „	76,5 „	2,98
33,6 „	11,5 „	2,92	31 „	101 „	3,07

Die mittleren Verhältniszahlen beider Vergleichsreihen, 2,90 und 3,02, weichen um 4 Proz. voneinander ab.

3. Quantitative Bestimmung von D.

a) *Arbeitsvorschrift für die kolorimetrische Bestimmung von D.* In einer Flasche, die 250 ccm faßt, werden 20 bis 50 ccm der zu prüfenden Lösung mit der gleichen Menge Pufferlösung der $[H^{\cdot}] = 2 \cdot 10^{-8}$ bis $5 \cdot 10^{-9}$ (s. S. 13) und 1 Tropfen Toluol versetzt. Das Gemisch bleibt unter Sauerstoff bei Atmosphärendruck im Brutschrank bei 35 bis 40° so lange verschlossen stehen, bis es nicht mehr dunkler wird. Nach je 24 Stunden wird das Gemisch mit der Vergleichslösung verglichen.

Sollte die zu prüfende Melaninlösung ausnahmsweise so hell sein, daß kein Vergleich möglich ist, so wird die ursprüngliche[2]) D-Lösung unter dem Drucke von etwa 15 mm und bei einer Temperatur von 40° auf ein Zehntel ihres Volumens eingedampft. Diese konzentrierte D-Lösung wird dann mit dem gleichen Volumen Pufferlösung versetzt und oxydiert.

Sollte ausnahmsweise eine zu dunkle Melaninlösung entstanden sein, so wird die ursprüngliche[3]) D-Lösung mit Pufferlösung auf das Zehnfache verdünnt und dann oxydiert.

b) *Beispiele.* 1. 2,9 ccm m/100 D-Lösung wurden in einer Stöpselflasche von 250 ccm Inhalt mit Phosphatpuffer der $[H^{\cdot}] = 8{,}52 \cdot 10^{-9}$ auf 100 ccm aufgefüllt und blieben 72 Stunden lang im Brutschrank bei 38° stehen. Dann war die Lösung erschöpfend oxydiert. Folgende Schichthöhen der Versuchslösung und der Vergleichslösung entsprachen einander:

---

[1]) Vgl. *Hantzsch*, B. 59, 1096, 1926.

[2]) Um dem möglichen Ausflocken von Melanin vorzubeugen.

[3]) Verdünnen von Melaninlösung ist nur statthaft, wenn das Melanin nicht ausflockte und die Oxydation bei der hohen Konzentration noch quantitativ verlief.

Versuchslösung (2,9 ccm m/100 D in 100 ccm Lösung)	Vergleichslösung (1 ccm m/100 D in 100 ccm Lösung)	Verhältniszahl (Theorie: 2,90)
15,8 Teilstriche	47,5 Teilstriche	3,00
14 „	41 „	2,93
12,5 „	37 „	2,96
10,7 „	31,6 „	2,96
13 „	38 „	2,94

Wir fanden im Mittel 2,95 ccm m/100 D wieder. Fehler = + 2 Proz.

2.

Versuchslösung (3 ccm m/100 D in 100 ccm Lösung)	Vergleichslösung (1 ccm m/100 D in 100 ccm Lösung)	Verhältniszahl (Theorie: 3,00)
18 Teilstriche	52 Teilstriche	2,89
16,2 „	47,2 „	2,92
14,1 „	40,9 „	2,90
11,3 „	32,8 „	2,90

Wir fanden im Mittel 2,9 ccm m/100 D. Fehler = — 3 Proz.

3.

Versuchslösung (4,2 ccm m/100 D in 100 ccm Lösung)	Vergleichslösung (1 ccm m/100 D in 100 ccm Lösung)	Verhältniszahl (Theorie: 4,20)
12 Teilstriche	50,2 Teilstriche	4,19
11 „	45,2 „	4,12
10 „	42,5 „	4,25
12,2 „	49,5 „	4,09
10,9 „	45,7 „	4,18
10,3 „	42,8 „	4,15

Wir fanden im Mittel 4,16 ccm m/100 D. Fehler = — 0,8 Proz.

4. Quantitative Bestimmung von D und Tyrosin nebeneinander.

a) *Kolorimetrische Bestimmung von D neben Tyrosin.* Ein exakter qualitativer Nachweis des D neben Tyrosin ist mit Hilfe der Phosgenmethode[1]) möglich. Sehr kleine Mengen D lassen sich qualitativ neben Tyrosin durch fermentative Oxydation erkennen[2]).

Die quantitative Bestimmung von D neben Tyrosin läßt sich mit Hilfe der Melaninkolorimetrie durchführen. Denn D dunkelt im Gegen-

[1]) *H. Schmalfuss* und *H. P. Müller*, diese Zeitschr. **188**, 362, 1927.
[2]) *H. Schmalfuss* und *H. Werner*, Fermentforschung **8**, 423, 1925.

satz zum Tyrosin bei geeigneter Wasserstoffionenaktivität spontan. Diese Umwandlung des D wird durch Tyrosin nicht beeinflußt.

Versuch. In verschiedenen Gemischen von D- und Tyrosinlösungen wurde das D in der auf S. 14 beschriebenen Weise erschöpfend oxydiert und kolorimetrisch bestimmt.

	Angewandte Menge		Gefundene Menge D	Fehler
	Tyrosin mg	D mg	mg	Proz.
Vergleichslösung	—	0,566	0,566	—
Versuch 1	0,7368	0,4074	0,414	+ 1,5
„ 2	0,5040	0,8151	0,831	+ 1,9
„ 3	0,155	1,426	1,419	— 0,7

In gleicher Weise würde sich D auch neben anderen nicht spontan dunkelnden Stoffen bestimmen lassen.

b) *Kolorimetrische Bestimmung von Tyrosin neben D.* Die Menge Tyrosin läßt sich neben D als Differenz bestimmen, sobald die Gesamtmenge beider Aminosäuren und die Menge des D bekannt sind. Als gemeinsames Maß für die verschieden großen Moleküle des D und des Tyrosins eignet sich z. B. die Menge des Aminostickstoffs. Die Methoden von *Sörensen*[1]), von *van Slyke*[2]) und von *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz*[3]) sind für die geringen Konzentrationen zu ungenau. Dagegen war die Kolorimetrie nach *Harding* und *Lean*[4]) mit Hilfe von Triketohydrindenhydrat[5]) nach geringen Abänderungen brauchbar.

Da die Farbtöne der Lösungen aus D (rötlichviolett) und Tyrosin (violett) einerseits und aus Alanin (blau) andererseits zu verschieden zum Vergleich waren, wählten wir an Stelle der vorgeschriebenen Alaninlösung eine m/300 D-Lösung als Vergleichsgröße. Höhere Konzentrationen der Vergleichslösung ergaben ungenaue Werte.

Weiter ist erwünscht, eine bestimmte Wasserstoffionenaktivität, z. B. $[H^{\cdot}] = 0{,}12 \cdot 10^{-8}$, innezuhalten, damit die Verschiedenheit der Farbtöne auf ein Minimum reduziert wird. So konnte für dieses bisher

[1]) Diese Zeitschr. **7**, 45, 407, 1908.

[2]) Journ. of biol. Chem. **12**, 275, 1912; **16**, 120, 1913/14; **23**, 407, 1915.

[3]) Ber. **54**, 2988, 1921. Zweckmäßig fügt man bei dieser Bestimmung des D die dreifache Menge Alkohol hinzu und titriert mit n/10 wässeriger KOH und Phenolphthalein. Nach dieser Methode lassen sich zwar noch, wie wir feststellten, 5 ccm m/100 D mit einem Fehler von — 3 Proz. titrieren, aber Lösungen von m/2000 und darunter geben erhebliche Fehler.

[4]) Journ. of biol. Chem. **20**, 217, 1915.

[5]) Das Triketohydrindenhydrat wurde uns freundlicherweise von der I. G. Farbenindustrie A.-G. zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle bestens danken.

noch nicht geprüfte und sehr schwer zu bestimmende Säurengemisch die Fehlergrenze von ursprünglich — 71 bis + 15 Proz. auf ± 4,5 Proz. herabgedrückt werden.

Arbeitsvorschrift. Je 1 ccm der zu untersuchenden Lösungen und der Vergleichslösung (m/300 D) werden mit je 1 ccm einer 10proz. wässerigen Pyridinlösung und 1 ccm einer frisch bereiteten 2proz. Lösung von Triketohydrindenhydrat versetzt und 20 Minuten lang im Wasserbad erhitzt. Dann läßt man abkühlen und verdünnt jeweils mit Pufferlösung[1]) der $[H^{\cdot}] = 0{,}12 \cdot 10^{-8}$ auf 100 ccm. Die scheinbaren Helligkeiten dieser Lösungen werden z. B. in einem *Wolff*-Ablaufkolorimeter verglichen. Als Lichtquelle dient dann zweckmäßig eine halbmattierte Metallfadenlampe von 55 Watt, die am Grunde eines Pappkastens (28 . 15 . 15 cm) befestigt ist. Um das Licht möglichst gleichmäßig zu verteilen, ist die Öffnung des Kastens mit dünnem Pergaminpapier, 15 . 15 cm, verblendet. Das Pergaminblatt befindet sich vor dem Kolorimeter in einer Entfernung von 10 cm.

Beispiele[2]):

	Angewandte Menge		Gefundene Menge			Berechnet		
	D mg	Tyrosin mg	D mg	Fehler Proz.	Amino-N mg	D-Amino-N mg	Tyrosin mg	Fehler Proz.
Vergleichslösung der Melaninkolorimetrie	1,97	—	—	—	—	—	—	—
Vergleichslösung der N-Kolorimetrie . .	0,566	—	—	—	—	—	—	—
Versuch 1	0,1358	0,2456	0,138	+ 1,45	0,0294	0,00980	0,253	+3,1
„ 2	0,2717	0,1680	0,277	+ 1,9	0,0321	0,0195	0,163	−2,97
„ 3	0,4754	0,0517	0,473	— 0,65	0,0376	0,03365	0,0512	−0,98

Über weitere Anwendungen der Melaninkolorimetrie werden wir in Kürze berichten.

Zusammenfassung.

1. l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure läßt sich im Gegensatz zu anderen Chromogenen leicht quantitativ in Melanin überführen, ohne daß das gebildete Melanin in verdünnten Lösungen ausflockt.

2. Farbton und Farbtiefe einer bestimmten Melaninlösung wechseln mit ihrer Schichthöhe. Aus Farbwechsel allein darf also nicht auf

[1]) Siehe S. 11.

[2]) Vom gefundenen Gesamtstickstoff wird die errechnete Stickstoffmenge des gefundenen D abgezogen und der so erhaltene Tyrosin-Stickstoff auf Tyrosin umgerechnet.

chemische Umwandlung oder Änderung des Dispersitätsgrades geschlossen werden.

3. Die endlichen Farbtiefen und Farbtöne von Melaninlösungen aus l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure sind unter sonst gleichen Umständen gleich, einerlei, ob das Melanin spontan oder fermentativ entstand. Dies spricht dafür, daß die gebildeten Produkte in beiden Fällen gleich sind.

4. Es wird eine Methode angegeben, nach der l-β-3, 4-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure und Tyrosin nebeneinander in Lösungen der Konzentrationen m/2000 bis m/30000 bestimmt werden können.

Über den Einfluß von Mineralsalzen auf den Stoffwechsel.

Von

O. Kauffmann-Cosla und Walter Zörkendörfer.

(Aus dem städtischen hygienischen und balneologischen Institut in Marienbad.)

(Eingegangen am 22. Januar 1927.)

Als Beispiel einer dysoxydativen Carbonurie unter den Stoffwechselkrankheiten kommt in erster Linie der Diabetes in Betracht.

Bei diesem ist die Ausscheidung von Glykose durch den Harn allgemein bekannt, manchmal finden sich auch Ketonkörper (β-Oxybuttersäure, Acetessigsäure und Aceton). Es kommen aber auch andere N-freie C-Verbindungen in gesteigerter Menge vor. So hat *P. Mayer* (1) das gelegentliche Auftreten von Glucuronsäure im diabetischen Harn gefunden; *Meyerhof* (2), *Embden* (3), *Fletcher* und *Hopkins* (4) haben gezeigt, daß der Abbau der Kohlehydrate bei der Arbeitsleistung des Muskels kein reiner Oxydationsprozeß ist, sondern daß anoxybiotischer Zerfall des Zuckers den Abbau einleitet und die Oxydation erst bei weiteren Stufen eintritt; daß dieser erste Abbau zu Milchsäure über das Lactacidogen *Embdens* geht, welches wieder der Hexosediphosphorsäure *Youngs* (5) nahe steht. *Neuberg* (6) hat das Ferment Carboxylase gefunden, welches aus dem Zuckerabbauprodukt Brenztraubensäure, Acetaldehyd und Kohlendioxyd bildet. *Neuberg* und *Gottschalk* (6) konnten mit der Abfangmethode *Neubergs* einwandfrei den wichtigen Beweis liefern, daß bei Zusatz von Insulin zu einem Leberbrei neben der Verstärkung der Glykolyse auch eine Vermehrung des Acetaldehyds erfolgt, und dieser ist von *Macleod* (Kohlenhydratstoffwechsel und Insulin, Monogr. 1927) voll bestätigt worden. *Kauffmann-Cosla* und *Roche* (7) haben bei Respirationsversuchen mit Ochsenblut in vitro neben der erhöhten Glykolyse ebenfalls eine Anreicherung an Acetaldehyd gefunden; auch *Hirsch* (8) hat Acetaldehyd als Abbaustufe von Zucker im Muskel nachgewiesen. Daher können wir Acetaldehyd als eine konstante Abbaustufe im Zuckerstoffwechsel betrachten. Bei Krankheitszuständen, wobei man schon lange eine Störung im Zuckerabbau vermutet hat, wie beim Diabetes, ist es *Stepp* (9) gelungen, eine Acetaldehydvermehrung im Harn und im Blut nachzuweisen.

Die alte Erfahrungstatsache, daß Trinkkuren mit Glaubersalzquellen Diabetes günstig beeinflussen, veranlaßt uns, die neuen Erkenntnisse darauf anzuwenden. Es liegen ja aus neuerer Zeit exakte Beobachtungen darüber vor, daß durch anorganische Substanzen Ionen im allgemeinen und die Anionen der Glaubersalzquellen insbesondere Wirkungen auf den Zuckerabbau, den Stoffwechsel überhaupt, auf endokrine Funktionen und fermentative Vorgänge ausgelöst werden können. *P. Mayer* (10) hat fest-

gestellt, daß mit Glaubersalzwässern im alkalischen Milieu die Abartung des Zuckerabbaues durch Hefe nach der dritten Vergärungsform erzielt wird, und daß tägliche Zufuhr von Karlsbader Wasser (eines Glaubersalzwassers) bei Kaninchen eine Erniedrigung des Blutzuckers bewirkt; *Arnoldi* und *Roubitschek* (11) fanden, daß hierdurch der Blutzucker bei Diabetikern sinkt und die Acidose verringert wird. *Kopf* (12) hat im hiesigen Institut gefunden, daß zwischen Marienbader Ferdinandsbrunnen und Schilddrüsenpräparaten ein Synergismus in bezug auf Reduktion der Körpergröße, aber ein Antagonismus in bezug auf die Entwicklung von Kaulquappen besteht.

Verschiedene Autoren zeigten den innigen Zusammenhang zwischen Phosphat und Kohlehydratabbau. *Iwanoff* (13), *Harden* und *Young* (5) haben organische Bindung der Phosphorsäure an Zucker zu Hexosediphosphorsäure nachgewiesen, welche *Neuberg* (6) als Fructosediphosphorsäure erkannt hat. Daß Phosphorsäure eine wichtige Rolle im Kohlehydratabbau spielt, ergibt sich aus den Arbeiten von *Fletcher* und *Hopkins* (4) und *Embden* (3); das Lactacidogen, der Hexosediphosphorsäure von *Harden* und *Young* nahestehend, zerfällt in Milchsäure und Phosphorsäure, erstere wird weiter abgebaut, letztere wiederholt den Prozeß; der Kohlehydratabbau erfolgt nur unter intermediärer Bindung an Phosphorsäure. Phosphatzufuhr bewirkt nach *Elias* und *Weiss* (14) Herabsetzung von Harn- und Blutzucker. *Kauffmann-Cosla* (7) fand vermehrte P-Ausscheidung bei verminderter Oxydationsfähigkeit (dysoxydativer Carbonurie), zeigte den Einfluß von Phosphaten in seinen Arbeiten über Insulinwirkung bei Avitaminose und zusammen mit *Roche* (7), daß das Phosphation auch in vitro die Wirkung des Insulins auf die Glykolyse erhöht.

Nachdem *Stransky* (15) eine P-Retention nach Zufuhr von Glaubersalzquellen gefunden hatte und nach *Wiechowski* und *Stranskys* (16) Beweis einer Änderung im Mineralstoffgehalt des Körpers durch Glaubersalzquellen lag es nahe, auch in der Beeinflussung von Diabetes durch solche Quellen an eine Mitwirkung von Phosphaten zu denken. Deshalb wurde in unserer Beobachtungsreihe auch das Verhalten der Phosphationen in Harn und Fäzes berücksichtigt.

Die Beobachtungen wurden an Einheimischen, Marienbader Diabetikern, gemacht, die in ihrer gewöhnlichen Häuslichkeit lebten, außer der Trinkkur und der festen aber nicht kohlehydratfreien Diäteinstellung weder eine andere medikamentöse oder Badekur gebrauchten; bei solchen Verhältnissen ist der Einwand hinfällig, daß der Aufenthalt im Kurort mit seinen psychischen Einflüssen, klimatischen und hygienischen Vorteilen den Hauptfaktor der Therapie darstelle, ein Einwand, der schon oft, in jüngster Zeit erst wieder bei aller Anerkennung der Heilerfolge in Kurorten von *Isaac* (17) erhoben worden ist.

Methodik und Berechnung.

Der Kohlenstoff wurde durch organische Elementaranalyse in der Ausführung nach *Kauffmann-Cosla*, Harnzucker polarimetrisch, Stickstoff nach *Kjeldahl*, Phosphat mittels Uranyltitration, Acetaldehyd nach *Stepp* und *Neuberg*, Blutzucker nach der neuen *Bang*schen Methode, bestimmt.

Die respiratorischen Versuche wurden morgens nüchtern nach einstündiger Ruhe mit dem Apparat nach *Knipping* ausgeführt; die Gasmengen sind in Volumen, reduziert auf 0° und 760 mm Druck, angegeben.

Der Quotient C/N wird in folgender Weise berechnet: man bestimmt den gesamten C und N in der 24stündigen Harnmenge. Vom C-Wert wird der im Zucker (und in den Acetonkörpern) enthaltene C abgezogen. Mit diesem Rest-C wird das Verhältnis C/N berechnet. Zur Erläuterung diene folgendes Beispiel: Ein Patient hatte eine C-Ausscheidung von 67 g, eine Zuckerausscheidung von 62 g, worin 24,8 g C enthalten sind[1]); der C-Gehalt von Aceton und Acetessigsäure beträgt 0,23 g, zusammen für Zucker und Acetonkörper 25,03 g. 67 — 25,03 = 41,97, rund 42 g Rest-C. Die N-Ausscheidung beträgt 6 g. C/N = 42 : 6 = 7,0. Um den dysoxydablen C zu berechnen, müssen wir den normalen C-Gehalt des Harns vom Rest-C abziehen. Wir können den normalen C-Gehalt allerdings nur mit einem Durchschnittsfaktor berechnen, der nach *Kauffmann-Cosla* 0,8 beträgt. 1 g N entspricht 0,8 g C, also entsprechend 6 g N 4,8 g C. Der dysoxydable C (dys. C) beträgt also 42 — 4,8 = 37,2 g. Nach diesen Erläuterungen wollen wir die Ergebnisse unserer Versuche darstellen. Die Patienten waren bei ziemlich freier, aber durch die ganze Versuchszeit gleichbleibender Kost eingestellt und erhielten an Kohlehydratnahrung täglich 100 g, einzelne später 150 bis 200 g als Semmel.

I. Die Patientin *H.*, 63 Jahre alt, 65,7 kg, leidet schon seit langem an Diabetes. Sie hat früher Aceton ausgeschieden. Während unserer Versuche bekam sie 100 g Brot, 250 g Milch, 200 g Fleisch, 200 g Gemüse, 50 g Butter und 75 g Käse. Während der Vorperiode schied sie täglich 2,5 g Zucker = 1,0 g C aus und 13,8 g Gesamt-C. Der Rest-C beträgt 13,8 — 1,0 = 12,8 g, der N 12,1 g, das entspricht normalerweise 9,7 g C; C/N = 1,06 g, der dys. C beträgt 12,8 — 9,7 = 3,12 g, was etwa 8 g Zucker entspricht, also mehr als dem Dreifachen des ausgeschiedenen Zuckers. Die Acetaldehydausscheidung betrug 36 mg pro die.

In der ersten Trinkperiode (Marienbader Kreuzbrunnen) von 5 Tagen bleibt der Zucker unverändert 2,5 g, der Gesamt-C sinkt von 13,8 auf 10,56, folglich beträgt der Rest-C 9,66 g; der N wurde mit 12,6 bestimmt, der Quotient C/N betrug 0,77, also ein normaler Wert, und der dys. C ist verschwunden. Es ist also bei gleichbleibender Zuckerausscheidung die Oxydationsfähigkeit bedeutend gestiegen, denn es waren anfangs von unabgebauten Kohlehydraten weniger als ein Viertel als Zucker, mehr als drei Viertel als dys. C ausgeschieden worden. Acetaldehyd ist auf 27 mg gesunken.

In weiteren 3 Kurtagen ist die Patientin bei gleicher Kost zuckerfrei, Gesamt-C beträgt 9,06, N = 12,21, C/N = 0,74, Acetaldehyd 24 mg (nach *Stepp* normal).

Nun sind wir mit der Brotzufuhr von 100 g auf 150 g und einige Tage später auf 200 g Semmel gestiegen. Die Patientin blieb zuckerfrei, dys. C ist am ersten Tage der Zulage wieder mit 6,28 g aufgetreten (Zucker = 0, Gesamt-C = 16,2 g, N = 12,4 g, C/N = 1,3, dys. C = 6,28 g), dann aber auch bei der höheren Brotmenge wieder vollständig verschwunden (Schlußbefund: Zucker = 0, Gesamt-C = 9,8 g, N = 13,0 g, C/N = 0,75, dys. C = 0).

---

[1]) Berechnet nach dem Verhältnis: $C_6H_{12}O_6 : C_6 = CH_2O : C = 30 : 12 = 1 : 0,4$.



Die Phosphatausscheidung betrug anfangs und in der ersten Trinkperiode 1,55 g P_2O_5 und sank auf 1,3 g. Der Blutzucker war von Anfang an nicht erhöht, er stand dauernd auf 0,12 Proz.

Beim respiratorischen Versuch war der O-Verbrauch 0,197 L/M, die CO_2-Ausscheidung 0,177 L/M, der respiratorische Quotient (R.-Q.) 0,9 in der Vorperiode. Nachdem Zucker und dys. C bereits verschwunden waren und die Brotnahrung auf 150 g erhöht war, wobei über 6 g dys. C aufgetreten waren, betrug der O-Verbrauch 0,194 L/M, die CO_2-Ausscheidung 0,134 L/M, der R.-Q. 0,7, die Senkung geht also parallel mit dem Wiederauftreten von dys. C. Nach einer weiteren Woche, als der dys. C trotz gleichbleibender und weiter erhöhter Kohlehydratzufuhr wieder geschwunden war, betrug der O-Verbrauch 0,197 L/M, ist also unverändert geblieben, die CO_2-Ausscheidung ist aber auf 0,192 L/M, der R.-Q. auf 0,97 gestiegen.

Wir ersehen also, daß die Patientin, welche bei 100 g Brot 2½ g Zucker als Glykose und 8 g Zucker in Form von dys. C ausgeschieden hatte, unter Zufuhr von Marienbader Kreuzbrunnen zuckerfrei und frei von dys. C wird, auch bei 200 g Brot weder Zucker noch dys. C ausscheidet, dabei aber eine deutliche Erhöhung des R.-Q. und eine P-Retention aufweist.

II. Die Patientin *N.*, im Alter von 57 Jahren, mit einem Körpergewicht von 106 kg, bekam täglich 500 g Milch, 200 g Fleisch, vier Eier, 200 g Gemüse, 50 g Butter, 75 g Schweizerkäse und 100 g Brot. Die Zuckerausscheidung betrug anfangs in einer viertägigen Periode 4,5 g = 1,80 g C pro Tag, der Gesamt-C war 16,74 g, folglich ein Rest-C von 16,74 — 1,80 = 14,94 g, N = 12,7 g, folglich C/N = 1,18. Der dys. C beträgt 4,78 g, etwa 12 g Zucker entsprechend, Acetaldehyd 86 mg. Nun bekam die Patientin täglich Marienbader Kreuzbrunnen, und in den ersten 5 Tagen der Trinkkur erhalten wir als Mittelwert pro Tag eine Zuckerausscheidung von 2,6 g mit 1,04 g C, einen Gesamt-C von 11,4 g, folglich einen Rest-C von 10,36 g; N wurde mit 12,1 bestimmt, C/N ist also 0,86, der dys. C 10,36 — 9,68 = 0,68, Acetaldehyd = 67 mg. In der nächsten Periode von 4 Tagen war der Harn gänzlich zuckerfrei, Gesamt-C = 9,4 g, N = 11,8 g, C/N = 0,796 = rund 0,8. Dieser Quotient ist also normal. Es läßt sich hier zwar ein Wert für dys. C von 0,4 g errechnen, der aber innerhalb der Fehlergrenzen liegt und praktisch = 0 ist. Der dys. C ist also ebenso wie Zucker verschwunden; Acetaldehyd ist auf 44 mg gesunken.

In einer weiteren Periode bekam die Patientin noch eine Zulage von 50 g Brot. Sie blieb weiter frei von Zucker und von dys. C. Die P-Ausscheidung in der Vorperiode betrug im Harn 2,74, im Kot 1,96 g, in der ersten Trinkperiode im Harn 1,74, im Kot 1,77, in der dritten Trinkperiode im Harn 1,0, im Kot 1,13 g P_2O_5. Der Blutzucker sank von 0,17 in der Vorperiode auf 0,12 Proz.

Es ergibt sich, daß Zucker und dys. C unter der Einwirkung der Glaubersalzquellen in kurzer Zeit verschwunden sind, daß der Quotient C/N auf die Norm zurückgegangen ist, Acetaldehyd auf die Hälfte, der erhöhte Blutzuckerspiegel auf normal gesunken ist, eine deutliche P-Retention eingetreten und die Toleranz für Kohlehydrate bedeutend gestiegen ist.

III. Der Patient *F.*, 61 Jahre alt, 93 kg, leidet seit mehreren Jahren an Diabetes. Er bekommt täglich 100 g Weißbrot, 500 g Milch, 200 g Fleisch, 200 g Gemüse, vier Eier, 50 g Butter und 75 g Schweizerkäse. In der Vorperiode von 4 Tagen scheidet er im Mittel aus: 16,5 g Zucker, entsprechend 6,60 g C, insgesamt 18,75 g C, nach Abzug des Zucker-C 12,15 g Rest-C und 16,08 g N. C/N = 0,76, also normal, kein dys. C vor-

handen. Nun bekam er Marienbader Ferdinandsbrunnen und hat in den nächsten 2 Tagen eine tägliche Zuckerausscheidung von 14 g, entsprechend 5,60 g C. Der Gesamt-C betrug 16,73 g, nach Abzug von 5,60 bleibt ein Rest-C von 11,13 g. Der gesamte N betrug 16,2 g, C/N daher 0,69. Nach weiteren 3 Tagen der Trinkkur hatte er eine Zuckerausscheidung von 6,8 g = 2,72 g C, einen Gesamt-C von 14,16 g, einen Rest-C von 11,44 g, eine N-Ausscheidung von 16,3 g und einen C/N-Quotienten von 0,70. 2 Tage später war er zuckerfrei. Gesamt-C betrug 11,5 g, N = 16,0 g, C/N = 0,72. Die P-Ausscheidung im Harn betrug in der Vorperiode 3,6 g, während der Trinkkur abfallend auf 3,1 bis 2,44 g P_2O_3. Im respiratorischen Versuch war anfangs der O-Verbrauch 0,2 L/M, die CO_2-Ausscheidung 0,158 L/M, der RQ 0,79. Nach 8 Tagen Trinkkur bei 3,5 g Zucker O-Verbrauch = 0,21 L/M (+ 5 Proz.), CO_2-Ausscheidung 0,184 L/M (+ 15 Proz.), R.-Q. = 0,87.

Es stellte sich also heraus, daß unter Zufuhr von Marienbader Ferdinandsbrunnen der Harnzucker verschwand und auch der Teil des gesamten C, der dem Zucker entspricht, die P-Ausscheidung gesunken ist, der O-Verbrauch mäßig, die CO_2-Ausscheidung stärker gestiegen ist und der R.-Q. erhöht ist.

IV. Die Patientin *S.*, 62 Jahre alt, 52,9 kg, hat seit mehreren Jahren Diabetes und zeitweise Acetonkörper ausgeschieden. Sie bekam 100 g Weißbrot, 250 g Milch, 200 g Fleisch, zwei Eier, 200 g Gemüse, 50 g Butter und 50 g Schweizerkäse. In der dreitägigen Vorperiode schied sie im Mittel 95 g Zucker aus. Der Gesamtharn-C betrug 45 g. Nach Abzug des Zucker-C von 38,0 g bleibt ein Rest-C von 7,0 g. Die N-Ausscheidung betrug 8,4 g, so daß das Verhältnis C/N = 0,835 ist. Diesem N entspricht normalerweise ein C-Gehalt von 8,4 × 0,8 = 6,72 g. Der dys. C errechnet sich demnach zu 7,0 — 6,7 = 0,3 g. Die Acetaldehydausscheidung betrug täglich 48 mg. Bei Zufuhr von Marienbader Alfredsquelle, einer mäßig hypotonischen Glaubersalzquelle, sinkt der Zucker in den ersten Tagen im Mittel auf 60 g, das sind 24,0 g C. Der Gesamt-C betrug täglich 37 g, der N 9,1 g. Daraus ergibt sich ein Rest-C von 13,0 g, ein C/N von 1,44 und ein dys. C von 5,7 g, entsprechend 14 g Zucker. In dieser Periode ist also der Zucker von 95 auf 60 g gesunken; dys. C, der vorher kaum nachweisbar war, ist dabei einem Werte von 14 g Zucker entsprechend aufgetreten, also das Zuckerminus von 35 g bisher nur zum Teil abgebaut. Acetaldehyd ist auf 36 mg gesunken. In den nächsten 3 Tagen betrug die Zuckerausscheidung im Tagesmittel 26 g, entsprechend 10,4 g C, der Gesamt-C hat den Wert von 17,26 g, der Rest-C also 6,86 g. Die N-Ausscheidung betrug 9,0 g, C/N folglich 0,76. Dys. C ist nicht mehr vorhanden, Acetaldehyd von 48 mg auf den normalen Wert von 26 mg zurückgegangen.

Phosphat betrug in der Vorperiode im Harn 1,73, im Kot 0,63 g. In der Trinkperiode im Harn 1,51, im Kot 0,4 g, am Schluß im Harn 1,32 g P_2O_5. Der Blutzuckergehalt war anfangs 0,25 Proz., am Schluß 0,125 Proz. Im respiratorischen Versuch waren 0,18 L/M O, 0,125 L/M CO_2, 0,64 R.-Q. in der Vorperiode, nach der Trinkkur 0,212 L/M O (+ 17,8 Proz.), 0,197 L/M CO_2 (+ 46 Proz.), R.-Q. = 0,92. Dieser Patientin war es aber nicht möglich, länger bei der gleichen Kost zu bleiben und wir mußten sie deshalb aus fortgesetzten Versuchen ausscheiden. Trotzdem geht daraus hervor, daß es uns gelungen war, *die Patientin unter ungünstigen Verhältnissen schon binnen 8 Tagen bei 100 g Brot von 95 g Zucker auf 26 g zu bringen und den anfangs aufgetretenen dys. C wieder zum Verschwinden zu bringen; die erhöhte Acetaldehydausscheidung zur Norm, den erhöhten Blutzuckerspiegel fast*

zur Norm zu bringen, eine deutliche P-Retention zu erzielen und den abnorm herabgesetzten R.-Q. unter bedeutendem Steigen des O-Verbrauchs und starker Erhöhung der CO_2-Ausscheidung auf einen reichlich normalen Wert zu bringen.

V. Der Patient *B.* ist 54 Jahre alt und wiegt 81 kg. Er bekommt täglich 100 g Brot, 500 g Milch, 200 g Fleisch, vier Eier, 200 g Gemüse, 50 g Butter und 75 g Schweizerkäse. Er hat vor der Trinkkur in einer Periode von 3 Tagen im Tagesmittel 60 g Zucker mit 24 g C und 43,0 g Gesamt-C ausgeschieden; der Rest-C betrug 19,0 g, N 12,3 g, C/N = 1,57. Der dys. C betrug also 19,0 − 9,84 = 9,16 g, etwa 23 g Zucker entsprechend. In der ersten Trinkperiode von 3 Tagen schied er täglich 40 g Zucker = 16 g Zucker-C, 29,28 g Gesamt-C, 11,0 g Gesamt-N aus; der Rest-C beträgt folglich 13,28 g, C/N 1,21, dys. C 4,38 g, entsprechend etwa 11 g Zucker.

In der zweiten Trinkperiode waren 29 g Zucker = 11,6 g C, 19,37 g Gesamt-C, 7,77 g Rest-C, 11,1 g N, C/N = 0,7; dys. C war also nicht mehr vorhanden.

Bei diesem Patienten sollen die Ergebnisse der respiratorischen Versuche in Anbetracht der Schlußfolgerungen ausführlicher dargestellt werden. 1. Versuch von 14 Minuten Dauer. O-Verbrauch 5,24, CO_2-Ausscheidung 1,6 Liter, R.-Q. = 1,6 : 5,24 = 0,305. Der O-Verbrauch pro Minute errechnet sich hieraus zu 0,375, die CO_2-Ausscheidung zu 0,114 L/M. Nach 15 Minuten Ruhe wird der Versuch wiederholt und jetzt scheidet er in 15 Minuten 1,73 Liter CO_2 aus und verbraucht 5,71 Liter Sauerstoff, der R.-Q. ist hiernach 0,303. Der O-Verbrauch pro Minute ist 0,38, die CO_2-Ausscheidung 0,115 L/M. Der Versuch ist doppelt ausgeführt worden mit vollkommen übereinstimmenden Werten; wir erhalten einen außerordentlich niedrigen R.-Q., wie er bisher in der uns zugänglichen Literatur nur von *Riethus* (18), *Mares* (19) und *Pembrey* (20) angegeben ist. Es ist uns bewußt, daß namhafte Physiologen einen so niedrigen Wert nicht anerkennen. Bei der guten Übereinstimmung beider Parallelbestimmungen glauben wir aber, wesentliche Versuchsfehler ausschließen zu können, und geben diese Werte mit aller Reserve wieder. Jedenfalls ergibt sich daraus, selbst wenn die absolute Zahl nicht ganz stimmen sollte, eine bedeutende Erniedrigung des R.-Q. Es ist ja nicht ausgeschlossen, daß in pathologischen Fällen, die außerhalb der physiologischen Normen stehen, doch sonst kaum beobachtete Werte möglich sind, und wir verweisen auf eine Äußerung *A. Löwys* a. d. J. 1911[1]). Bei einem zweiten Versuch, der nach zwölftägiger Trinkkur mit Marienbader Ferdinandsbrunnen unter den gleichen Bedingungen wie der erste ausgeführt worden ist, wurden bei einer Zuckerausscheidung von 30 g im Tage ohne dys. C folgende Werte in 10 Minuten beobachtet: O-Verbrauch = 5,23, CO_2-Ausscheidung = 4,6 Liter, R.-Q. = 0,88. Der O-Verbrauch pro Minute beträgt 0,52 gegen 0,37 bis 0,38 L/M der Vorperiode, ist also um 44 Proz. erhöht. Die CO_2-Ausscheidung pro Minute ist von 0,114 auf 0,46 gestiegen, also sehr stark vermehrt.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß unter Einwirkung des Marienbader Mineralwassers der Harnzucker innerhalb 8 Tagen um 50 Proz. gesunken

---

[1]) „Die normalen Grenzwerte des R.-Q. von 0,7 bis 1,0 gelten natürlich nur, wenn die zum Zerfall kommenden Substanzen bis zu ihren letzten Endprodukten abgebaut werden, sie brauchen aber nicht mehr zu gelten, wenn intermediäre Produkte gebildet werden, die unverbrannt ausgeschieden werden.“



ist, der dysoxydable Harn-C, der einer Menge von 23 g Zucker entsprochen hat, verschwunden ist, daß der gnaz abnorm erniedrigte R.-Q. wieder auf die normale Höhe angestiegen ist, daß der O-Verbrauch sich um 44 Proz. gesteigert hat und die CO_2-Ausscheidung auf das Mehrfache angestiegen ist.

Zusammenfassung.

Wir haben gesehen, daß es uns bei beiden Fällen von leichtem Diabetes, denen wir im Laufe der Beobachtung größere Kohlehydratgaben zugelegt haben, gelungen, ist, die Toleranz für Kohlehydrate wesentlich zu erhöhen. Beide Patienten, die für 100 g Brot nicht tolerant waren, konnten wir zur vollen Toleranz für 150 bzw. 200 g bringen.

Acetaldehyd als Beispiel intermediärer Stoffwechselprodukte ist bei einer Patientin von 36 mg auf normal, d. h. 24 mg, gesunken, bei der anderen von 86 auf 44. Bei einer dieser Patientinnen konnte auch eine Erhöhung des R.-Q. und der CO_2-Ausscheidung erzielt werden. Der dysoxydable Harnkohlenstoff ist bei beiden verschwunden, der Gesamt-C um jenen Wert zurückgegangen, der dem verschwundenen Zucker und dys. C entspricht. Der Quotient C/N ist auf seinen Normalwert herabgegangen. Des weiteren ist eine deutliche Phosphorretention eingetreten, indem die Ausscheidung durch den Harn bei einer Patientin von 1,55 auf 1,08 und bei der anderen von 2,75 auf 1,13 gesunken ist, während die Phosphorausscheidung im Stuhle nicht gestiegen. sondern im Gegenteil ebenfalls etwas herabgegangen ist. Auch der Blutzucker ist bei einer dieser Patientinnen, bei der er auf 0.17 Proz. erhöht war, auf die Norm herabgegangen, bei der anderen war er überhaupt nicht erhöht.

Beim Fall *S.* ist die tägliche Zuckerausscheidung von 95 g auf 26 g gesunken. Der dys. C ist geschwunden und der Quotient C/N auf normale Höhe zurückgegangen. Das Acetaldehyd ist gesunken von 48 mg auf 26 mg, d. h. normal. Der gesamte C hat eine wesentliche Herabsetzung erfahren, und der Blutzucker ist von 0,25 auf fast normale Höhe von 0,13 Proz. zurückgegangen. Der O-Verbrauch ist um 18 Proz. gestiegen, die CO_2-Ausscheidung um 46 Proz. und der pathologisch erniedrigte R.-Q. von 0,46 ist auf 0,91 angestiegen.

Die Versuche, über die wir hier berichtet haben., gestatten uns folgende Schlußfolgerungen:

1. Durch Zufuhr der Marienbader Glaubersalzwässer kann der Zucker und der dys. C des Harns binnen kurzem bei leichten Fällen von Diabetes zum Schwinden gebracht, bei mittelschweren tief herabgedrückt werden. Der dys. C ist bei allen unseren Patienten verschwunden. Da nun der Harnzucker auch unter der Wirkung des Insulins nach *Bickel* und *Kauffmann-Cosla* erst dann völlig zurückgeht.



wenn der dys. C gänzlich verschwunden ist, wäre anzunehmen, daß bei länger dauernder Zufuhr von Marienbader Wasser auch mittelschwere Diabetiker nicht nur vollständig zuckerfrei werden, was empirisch längst bekannt ist, sondern auch zu ganz normaler Oxydationsfähigkeit gelangen, denn die Trinkperioden betrugen *nicht einmal die halbe Zeit* einer durchschnittlichen Brunnenkur.

2. Der Quotient C/N sinkt bei leichten und mittelschweren Diabetikern unter dem Einfluß des Marienbader Wassers auf die Norm zurück.

3. Auch die intermediären Abbauprodukte des Zuckers, wie z. B. Acetaldehyd, gehen auf die Norm zurück.

4. Der Blutzucker sinkt unter Einfluß der Marienbader Glaubersalzquellen bei leichten und mittelschweren Diabetikern auf die Norm ab.

5. Unter Einwirkung der Marienbader Glaubersalzquellen tritt eine deutliche Phosphorretention ein.

6. Unter der Zufuhr von Marienbader Mineralwasser tritt eine deutliche Erhöhung des pathologisch erniedrigten R.-Q., des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlensäureausscheidung auf.

7. Eine Verminderung der Resorption von Nahrungsmitteln tritt auch unter dem Einfluß der abführenden Glaubersalzquellen nicht ein.

8. Alle diese Resultate gestatten uns zu sagen, daß diese Erfolge bei leichten und mittelschweren Diabetikern durch Marienbader Glaubersalzquellen auf einer Erhöhung der Oxydation durch die Zelle beruhen; wir wollen hier darauf hinweisen, daß solche Resultate bei Diabetikern bisher nur unter der Wirkung des Insulins bekannt waren.

9. Es läßt sich ferner der Schluß ziehen, daß auch die Entfettung, die man mit den Marienbader Glaubersalzquellen erzielen kann, nicht auf eine verminderte Resorption der Nahrung, sondern ebenfalls auf eine Erhöhung der Oxydationsfähigkeit des Körpers zurückzuführen ist.

Literatur.

1) *P. Mayer*, Zeitschr. f. klin. Med. **47**, 68, 1902. — 2) *Meyerhof*, Pflügers Arch. **182**, 1920. — 3) *Embden*, diese Zeitschr. **45**, 45, 1912; Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 1921; *Embden*, *Griesbach* und *Schmitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem **93**, 1914. — 4) *Fletcher* und *Hopkins*, Journ. of Phys. **1907**, Nr. 35. — 5) *Harden* und *Young*, Proc. Roy. Soc. **80**, 299, 1908; **81**, 528, **1909**; **82**, 321, 1909; diese Zeitschr. **32**, 173, 1911. — 6) *Neuberg*, diese Zeitschr. **83**, 244, 1917; 88, 145, 1918; **103**, 320, 1920; *Neuberg* und *Karczag*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**, 1911; diese Zeitschr. **71**, 1, 1915; *Neuberg*, *Gottschalk* und *Strauss*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 45; *Neuberg*, und *Färber*, diese Zeitschr. **78**, 238, 1916. — 7) *Kauffmann-Cosla*, Deutsch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 25; Virchows Arch. **259**, 1926; Klin. Wochenschrift 1925, Nr. 28; C. r. Soc. de Chem. de France 1925; *Kauffmann-Cosla*

und *Roche*, Ann. de Med. **20**, 1926; C. r. de Soc. biol. **95**, 1926; Arch. d. Mal. d. Reins etc. **2**, Nr. 4, 1926. — 8) *Hirsch*, diese Zeitschr. **117**, 113, 1921. — 9) *Stepp*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 1914; **114**, 1921; diese Zeitschr. **107**, 60, 1920. — 10) *P. Mayer*, Deutsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 25; diese Zeitschr. **131**, 1, 1922. — 11) *Arnoldi* und *Roubitschek*, Deutsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 8. — 12) *Kopf*, ebendaselbst 1925, Nr. 18; 1926, Nr. 21. — 13) *Iwanoff*, Trav. Soc. d. nat. 1905, S. 34. — 14) *Elias* und *Weiss*, Berl. klin. Wochenschr. 1921, Nr. 23. — 15) *Stransky*, diese Zeitschr. **122**, 1, 1921. — 16) *Wiechowski* und *Stransky*, Zeitschr. f. Balneol. **5**, 1912; Prager med. Wochenschr. 1914, Nr. 39. — 17) *Isaac*, Deutsch. med. Wochenschr. 1926, Nr. 43. — 18) *Riethus*, Arch. f. exper. Pathol. **44**, 1900. — 19) *Marés*, Soc. biol. 1892. — 20) *Pembrey*, Journ. of Physiol. **29**, 1903.

Zur Frage nach der Existenz der Diphtherietoxin-Adsorption durch Erythrocyten.

Von

N. I. Griasnow.

(Aus der Biochemischen Abteilung des Staatsinstituts für Mikrobiologie in Saratow.)

(Eingegangen am 26. Januar 1927.)

Im Jahre 1923 hat *Sbarsky* eine Arbeit veröffentlicht, in welcher er Beweise für die Adsorption der Eiweißabbauprodukte und des Diphtherietoxins durch Erythrocyten angeführt hat[1]). In meiner Arbeit, veröffentlicht im Jahre 1924[2]), konnte ich die Beobachtungen von *Sbarsky nicht* bestätigen. Im Jahre 1926 hat *Sbarsky* mit anderer Methodik wiederum einige Versuche über die Adsorption des Diphtherietoxins durch Erythrocyten mitgeteilt. Diese Versuche haben seine früheren Beobachtungen bestätigt[3]). *Glusmann* ist auch zum Schluß gekommen, daß Erythrocyten Diphtherietoxin adsorbieren[4]).

Anderer Meinung ist *Silber*. Nach ihm wird das Diphtherietoxin von Erythrocyten fast gar nicht adsorbiert[5]).

Beim Studium der Arbeiten von *Sbarsky* und *Glusmann* über die Adsorption des Toxins durch Erythrocyten fällt ihr allgemeiner methodischer Fehler auf: weder der eine noch der andere hat das Wasser berechnet, welches den Intraerythrocytenraum einnimmt. Indessen aber ist die Erythrocytenemulsion ein zweiphasisches System: Erythrocyten + Wasser. Die gegenseitigen Beziehungen zwischen Wasser und Erythrocyten sind nicht beständig, sondern verändern sich mit der Dauer und Kraft des Zentrifugierens. *Sbarsky* hat wie zu 4 ccm, so auch zu 8 ccm Erythrocytenemulsion zwei tödliche Dosen Toxins in 2 ccm physiologischer Lösung beigefügt, dabei enthalten aber 8 ccm

---

1) Diese Zeitschr. **135**, 30, 1923.
2) Ebendaselbst **145**, 63, 1924.
3) Ebendaselbst **169**, 113, 1926.
4) Ebendaselbst **177**, 309, 1926.
5) Vortrag auf dem X. Kongreß der Bakteriologen. Odessa.

Erythrocytenemulsion unter gleichen Bedingungen natürlich eine größere Menge flüssiger Phase als 4 ccm.

Es ist vollkommen begreiflich, daß ein Teil des zu der Erythrocytenemulsion hinzugefügten Toxins sich in der flüssigen Phase einfach verteilt, und deshalb enthält nach dem nachfolgenden Zentrifugieren 1 ccm des Zentrifugats etwas weniger Toxin als 1 ccm der anfänglich zugesetzten Lösung desselben. Bei Wiederholung eigener Versuche der Diphtherietoxinadsorption durch Erythrocyten berechnete ich die Menge der flüssigen Phase in der Erythrocytenemulsion und fügte derselben mit 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung so viel tödliche Toxindosen zu, daß 1 ccm der verdünnten, flüssigen Phase eine tödliche Toxindosis enthalte.

Die Berechnung der flüssigen Phase der Erythrocytenemulsion wurde mittels dauernden Zentrifugierens (2 Stunden lang) der für die Versuche angefertigten Erythrocytenemulsion durchgeführt.

Versuch 1.

4 ccm einer dreimal durchgespülten Erythrocytenemulsion vom Pferde werden in ein graduiertes Zentrifugiergläschen eingegossen. Zentrifugieren auf einer starken Zentrifuge binnen 2 Stunden. Oberhalb der sich festgesetzten Erythrocyten hat sich eine Wasserschicht von 0,3 ccm gebildet.

8 ccm derselben Erythrocytenemulsion werden nach Durchschütteln in ein Zentrifugiergläschen eingegossen. In 8 ccm genommener Emulsion sind 0,6 ccm Wasser vorhanden. Mit 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung werden so viel tödliche Toxindosen für ein Meerschweinchen hinzugefügt, daß 1 ccm der flüssigen Phase $(0,6 + 2 = 2,6$ ccm) eine tödliche Dosis Toxin enthalte.

Die Mischung steht im Brutschrank 1 Stunde lang bei 37°, ebenso wie das Kontrolltoxin (eine tödliche Dosis in 1 ccm). 1 Stunde darauf Zentrifugieren. 1 ccm von dem durchsichtigen Zentrifugat wurde dem Meerschweinchen Nr. 1, Gewicht 260,0, intradermal eingeführt. 1 ccm des Kontrolltoxins wurde dem Meerschweinchen Nr. 2, Gewicht 250,0 g, eingeführt. Meerschweinchen Nr. 1 starb vom fünften auf den sechsten Tag. Meerschweinchen Nr. 2 vom vierten auf den fünften Tag.

Versuch 2.

Auf dieselbe Weise wurde die Wassermenge in 4 ccm Erythrocytenemulsion festgestellt. Sie belief sich auf 0,5 ccm. Zu 8 ccm derselben Emulsion wurden mit 2 ccm physiologischer Lösung NaCl so viel Toxin beigefügt, daß 1 ccm der flüssigen Phase $(1 + 2 = 3)$ eine tödliche Dosis enthalte. Die Mischung wird durchgeschüttelt und im Brutschrank bei 37° 1 Stunde lang gehalten. 1 Stunde darauf Zentrifugieren.

Das Meerschweinchen Nr. 3, Gewicht 258,0 g welches 1 ccm des Zentrifugats erhalten hat, kam vom vierten bis fünften Tage um.

Das Kontrollmeerschweinchen Nr. 4, Gewicht 260,0 g starb 10 Stunden später als Nr. 3.

Versuch 3.

Wasser in der Erythocytenemulsion, 0,3 auf 4 ccm. Versuch der Toxinadsorption durch Erythrocyten wurde auf gleiche Weise wie in den zwei ersten Versuchen durchgeführt.

Das Meerschweinchen Nr. 5, Gewicht 220,0 g, welches 1 ccm des Zentrifugats erhalten hat, starb vom dritten auf den vierten Tag. Das Kontrollmeerschweinchen Nr. 6, Gewicht 220,0 g, starb ebenfalls vom dritten auf den vierten Tag.

In allen Fällen also, wo die Wassermenge in der Erythrocytenemulsion berechnet wurde, starben die Meerschweinchen, welche das Toxin, nach einstündigem Kontakt mit den Erythrocyten im Brutschrank, bekamen, fast gleichzeitig mit den Kontrolltieren. Geringe Schwankungen in der Zeit hängen von individuellen Besonderheiten der Meerschweinchen ab.

Somit ist es klar, daß die tödliche Toxindosis im Zentrifugat derselben in der Kontrolle gleich war.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 104.

Fortgesetzte Untersuchungen zur Lehre von der Harnabsonderung. Die Wirkungen der spezifischen Diuretica im allergischen Zustand.

Von

Burrel O. Raulston (Los Angeles, Kalifornien).

Aus dem physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 2. Februar 1927.)

Mit 15 Abbildungen im Text.

Die voraufgehenden Untersuchungen zur Lehre von der Harnabsonderung aus dem Berner physiologischen Institut hatten zu einer schärferen Ausarbeitung der Bedeutung der Wechselwirkung zwischen Gewebe und Blut für die Harnabsonderung unter physiologischen Bedingungen im Gesamtorganismus geführt. Dieselbe geschah methodisch vornehmlich durch Anwendung der spezifischen Diuretica, und die gefundenen Tatsachen und die daraus gezogenen Schlüsse gelten demnach zunächst nur für die Diurese unter dem Einfluß dieser Mittel. Es ergab sich, daß der dominierende Faktor der durch diese Stoffe veranlaßte Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut in seiner Art und Größe sei. Aber da gerade für diesen praktisch so wichtigen Fall das Ergebnis lautete, daß die spezifischen Diuretica einerseits keine Reizmittel für die Nierenzellen im Sinne der sekretorischen Theorie seien, andererseits aber auch die Änderungen im Filtrationsdruck und in den Bedingungen für etwaige Rückresorption ausfielen, war doch über den Spezialfall hinaus eine Einsicht in die Geschehnisse bei der Harnabsonderung gefördert worden. Es konnten ja auch im Anschluß

hieran durch *Nakao*[1]) der Einfluß des vegetativen Nervensystems und der Anteil gewisser Gewebsterritorien an dem Zustandekommen der Harnabsonderung nach Euphyllin dargelegt werden.

Die Auffassung, daß die Nierenzellen unter physiologischen Bedingungen infolge ihres feinen Ansprechens auf die Zustandsveränderungen, welche dem Blute durch die Geschehnisse im Gesamtorganismus aufgeprägt werden, die jeweilige Harnabsonderung bewerkstelligen, wird trotz Aufgabe der Vorstellung, daß die spezifischen Diuretica Reizmittel im Sinne der sekretorischen Theorie seien, dem prinzipiellen Standpunkt gerecht, daß die Nierenzelle als lebendiges Gebilde aktiv-autonom sich an der Harnbereitung beteiligt. Auch hierfür hat eine voraufgehende Arbeit von *Nakao*[2]) einen experimentellen Beweis erbracht, indem gezeigt wurde, daß bei Sauerstoffmangel, hervorgerufen durch Dyspnoe, trotz ausgeschlossener Gefäßverengerung und leicht erhöhten Blutdrucks die spezifische Euphyllindiurese ausblieb.

Vor allem aber gestattet die genannte Auffassung neue experimentelle Problemstellungen, um zu ihrer weiteren Ausgestaltung zu helfen. Mit einer solchen Problemstellung befaßt sich im Anschluß an die voraufgehenden Arbeiten meine nachfolgende, indem sie die Wirkungsweise der spezifischen Diuretica bei experimentell herbeigeführtem allergischen Zustande des Versuchstieres untersucht. Der allergische Zustand ändert die Eigenschaften und die Geschehnisse in den Gewebszellen, und vor allem wird die Permeabilität der Gewebszellen, wie aus einer Reihe von Arbeiten hervorgeht, geändert. Alles dies sind Momente, die günstige Aussichten für eine Untersuchung stellen, die darauf hinausgeht, in ihnen wesentliche Faktoren für die Harnabsonderung zu erblicken. Hierzu kommt noch ein weiteres Moment, nämlich, daß durch den allergischen Zustand auch die Nierenzellen als lebendige Gewebselemente mit betroffen sein können. Methodologisch liegt hierin unbestreitbar eine Komplikation vor, welche durch die Analyse der Erscheinungen abgeschwächt werden muß, sachlich-physiologisch aber etwas günstiges, weil einer einseitigen Betrachtungsweise entgegengewirkt wird.

Nach dem Gesagten mußte der Plan meiner Arbeit darin bestehen, durch parenterale Injektionen passender Stoffe einen allergischen Zustand hervorzurufen und die Harnabsonderung in demselben unter dem Einfluß von Euphyllin zu untersuchen, und zwar in annähernd der gleichen Weise, wie es in den voraufgehenden Arbeiten dieser Reihe geschehen ist. Zum Vergleich waren Voruntersuchungen an den gleichen

---

[1]) *H. Nakao*, diese Zeitschr. **178**, 342, 1926.
[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **173**, 41. 1926.

Tieren in nicht allergischem Zustande notwendig. Es hatte sich jedoch herausgestellt, daß auch eine weitere Voruntersuchung notwendig war, nämlich eine Beobachtung der normalen Harnabsonderung unter den Bedingungen, wie seit der Arbeit von *Curtis*[1]) im Berner physiologischen Institut die Harnabsonderung studiert wird. Ich darf die Methode als bekannt voraussetzen. Gerade weil sie eine möglichst physiologische ist, enthält sie variable Faktoren, die in den Bedingungen des physiologischen Organismus liegen und die der Beobachter nicht beherrscht, aber versuchen muß, zu erkennen. Beim normalen, in möglichst bequemer Lage aufgebundenen Kaninchen spielen die Einflüsse der verschiedenen Teile des Zentralnervensystems eine Rolle, über welche wir namentlich durch die Arbeiten von *Pick* und seinen Schülern aufgeklärt worden sind[2]). Vom Zentralnervensystem können sowohl hemmende wie auch erregende und schließlich hemmende Impulse, die enthemmend wirken, ausgehen. Die wechselnden Einflüsse der Umwelt vermögen diese Impulse zu wecken. Die Impulse können in mannigfacher Weise wirksam werden, entweder auf dem Wege des Kreislaufs oder auf dem Wege der extrarenalen Gewebe, oder durch Beeinflussung der Nierenzellen selbst. Hält man sich diese verwickelten Tatbestände vor Augen, so wird es nicht wundernehmen, daß normale Kontrollversuche durchaus ungleich ausfallen können. Man muß die äußersten Grenzen einigermaßen kennen lernen, um mit Sicherheit die Wirkung von etwaigen Eingriffen beurteilen zu können.

Normale Kontrollversuche.

Meine zahlreichen normalen Kontrollversuche wurden so ausgeführt wie die Hauptversuche. Kaninchen, welche mit Feuchtfütterung in der Art und Weise, wie sie *Curtis* beschrieben hat, vorbehandelt worden waren, wurden aufgebunden, warm gehalten und erhielten einen weichen sterilisierten Katheter in die Blase eingeführt. Worauf besonders geachtet wurde, war der Zustand ihrer Muskulatur. Gelegentlich sind die Tiere während der ganzen Zeit vollständig ruhig, gelegentlich aber beobachtet man eine gewisse motorische Unruhe. In einigen Fällen habe ich durch Manipulationen am Tiere eine gewisse dauernde Unruhe aufrecht zu erhalten versucht. Bestimmt wurden die Harnmengen meist in 10-Minutenperioden, der Kochsalzgehalt und daraus die gesamte während der Versuchsdauer ausgeschiedene Kochsalzmenge errechnet.

Ich lege eine Übersichtstabelle über zwölf einschlägige Kontrollversuche vor.

---

[1]) *George M. Curtis*, diese Zeitschr. **163**, 109, 1925.

[2]) *H. Molitor* und *E. Pick*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **107**, 180, 185, 1925; *H. Molitor*, ebendaselbst **113**, 171, 1926; *H. Molitor* und *E. Pick*, ebendaselbst **112**, 113, 1926.

Tabelle I.

Kontrollversuche.

Versuchstier Nr.	Harnmenge ccm	Versuchsdauer Min.	Maximale 10 M n. Diurese ccm	Gesamt-NaCl	Maximale NaCl-Proz.	NaCl-Proz. bei max. Diurese	Bemerkungen
9	33,7	120	17,9	0,0329	0,248	0,046	Periode 30 statt 10 Minuten
9	1,8	—	0,5	0,0033	0,503	—	Hyperglykämie
9	31,2	90	6,6	0,0248	0,321	0,049	Tier dauernd ruhig. NaCl-Anstieg im Blute.
9	32,3	120	5,7	0,0209	0,186	0,048	
10	4,6	60	2,1	0,0219	0,582	0,564	Tier dauernd unruhig
10	25,6	110	3,6	0,0248	0,172	0,068	Weniger unruhig als im vorhergehenden Versuch
6	53,1	140	9,1	0,0572	0,322	0,100	Tier dauernd zu Bewegungen veranlaßt
9	46,9	110	9,0	0,0315	0,619	0,036	Ruhig. Keine Blutzuckerveränderung
1	32,1	140	5,0	0,0201	0,266	0,051	Ruhig. Phasendiurese. NaCl-Konzentration niedriger werdend
10	13,8	80	2,6	0,0085	0,139	0,061	Künstliche starke Unruhe
6	14,3	120	2,5	0,0151	0,133	0,069	Wechselnd Ruhe und Unruhe. Kein Zucker
9	45,5	140	6,6*)	0,0241	0,118	0,050	Dauernd künstlich reflektorisch erregt. Kein Zucker.

*) Allmählich ansteigende Diurese.

Aus Tabelle I geht hervor, daß bei der von mir angewandten Methode es ohne jeden besonders auf die Diurese gerichteten Eingriff doch zu einer recht erheblichen Diurese kommen kann, bald ist die während einer Versuchsperiode gewonnene Harnmenge weit größer als diejenige, die man als normal anzusehen hat; bald ist die maximale Diurese während einer 10-Minutenperiode von einer Größenordnung, die man unbedenklich als gesteigerte Diurese ansprechen würde, hätte man vorher ein Diureticum injiziert. In zwei Versuchen habe ich maximale 10-Minutendiuresen von 9 ccm Harn erhalten. Nichtsdestoweniger lehrt einen der Durchschnittswert doch einen recht erheblichen Unterschied gegenüber Versuchen, in denen man Euphyllin gegeben hat. Aus neun solchen Versuchen erhielt *Curtis* für die durchschnittliche Menge des Maximums der Diurese in einer 10-Minutenperiode 13,8 ccm, während aus meinen zwölf Versuchen sich nur ein Durchschnittswert von 5,05 ccm ergibt. Ein weiteres Kriterium liegt in den Ausscheidungsverhältnissen des Kochsalzes. Die gesamte Kochsalzmenge, die ausgeschieden wird, ist stets sehr klein und die Konzentrationsverhältnisse des NaCl im Harn während der gesteigerten Diurese verraten nichts von der vermehrten Chloridausscheidung, die so charakteristisch für die Wirkung der spezifischen Diuretica vom Typus Euphyllin ist.

Die Ursachen für gesteigerte Diurese in meinen Kontrollversuchen können verschiedener Natur sein. Es kann beispielsweise der Fall vorkommen, daß unter zentralen Einflüssen Schwankungen der Permeabilität

der Gewebe eintreten, so daß, wenn auch in abgeschwächter Form, dieselben Diurese erregenden Bedingungen obwalten wie nach Injektion von Euphyllin. Ein Beispiel liefert der nachfolgende Versuch 26 vom 19. Januar 1926. In diesem Versuch verhielt sich das Tier ganz ruhig. Die Kurve der Konzentration der Chloride im Blute zeigt nach einem anfänglichen Sinken ein deutliches Ansteigen über den ursprünglichen Anfangswert, und parallel damit geht eine 50 Minuten lang anhaltende Steigerung der Diurese.

Tabelle II.

Versuch 26. 19. Januar 1926. Kaninchen Nr. 9. Kontrollversuch. Das Tier verhielt sich die ganze Zeit über ruhig.

Nr. der Harnprobe	Zeitintervall	Menge ccm	NaCl im Blut Proz.	NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g
1	Blase	110,0	—	0,053	—
2	10	1,0	—	0,103	0,0010
3	10	1,0	0,486	0,321	0,0032
4	10	1,5	0,470	0,294	0,0044
5	10	2,9	0,484	0,103	0,0029
6	10	5,8	0,490	0,054	0,0031
7	10	6,6	0,497	0,049	0,0032
8	10	6,3	0,499	0,045	0,0028
9	10	4,1	0,489	0,054	0,0022
10	10	2,0	0,490	0,099	0,0020

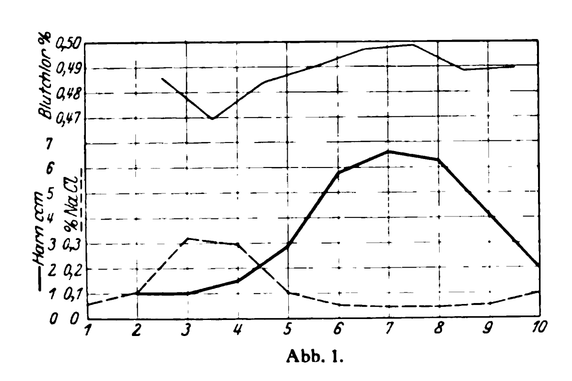


Abb. 1.

Anders liegt der Fall in Versuch 48 vom 14. Februar 1926. Hier begann in der sechsten 10-Minuten-Periode eine Diurese, welche sich steigerte und in der neunten, zehnten, elften und zwölften 10-Minuten-Periode sich dauernd annähernd auf der Höhe von 9 ccm hielt. Der wesentliche Faktor in diesen Versuchen war der, daß das Tier fortwährend zu Muskelunruhe angetrieben wurde und die biochemischen Folgen dieses Antreibens der Muskelunruhe möchte ich für die Diurese verantwortlich machen.

Tabelle III.

Versuch 48. 14. Februar 1926. Kaninchen Nr. 6. Kontrollversuch.

10h35′ . . . . . . Kaninchen auf dem Operationstisch.
10 41 . . . . . . Kaninchen katheterisiert.
11 00 . . . . . . Hautnadel eingeführt; nichts injiziert.

Das Tier wurde gezwungen, von der ersten bis zehnten Periode des Versuchs häufige Muskelbewegungen zu machen. Danach blieb es ruhig. Blutzucker mehr als 0,200 während wenigstens 40 Minuten. Kein Zucker im Harn.

Nr. der Harnprobe	Zeitintervall	Menge ccm	Zucker im Blut Proz.	NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g	Zucker im Harn Proz.	Zucker im Harn g	NaCl im Blut Proz.
1	Blase	62,0	0,127	0,017	—			0,517
2	10	0,5	0,177	0,035	0,0002			0,518
3	10	0,7		0,153	0,0011			0,530
4	10	0,7		0,255	0,0018			0,522
5	10	0,7	0,224	0,320	0,0022			
6	10	1,1						
7	10	1,8		0,168	0,0030			0,527
8	10	5,0	0,206	0,120	0,0060	keiner	keiner	
9	10	8,4		0,099	0,0083			
10	10	9,1		0,100	0,0091			0,520
11	10	8,7	0,173	0,083	0,0072			
12	10	9,0		0,083	0,0075			
13	10	3,7	0,155	0,126	0,0047			0,545
14	10	2.0		0,167	0,0033			
15	10	1,7		0,163	0,0028			

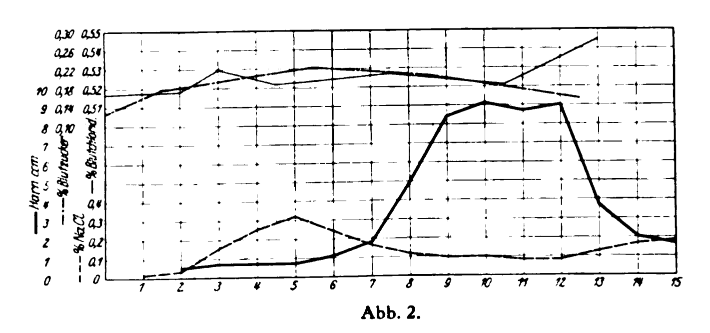


Abb. 2.

Schließlich möchte ich noch auf einen eigentümlichen phasischen Verlauf der Diurese aufmerksam machen, weil diese Art des Diureseablaufs bei der Betrachtung des allergischen Zustandes wiederkehren wird. Versuch 31 vom 26. Januar 1926 illustriert diesen Fall, für den sich irgend eine Erklärung aus den Versuchsdaten nicht geben läßt. Es handelt sich rein um Änderungen in der Wasserausscheidung, nicht aber um diejenige der Chloride.

Tabelle IV.

Versuch 31. 26. Januar 1926. Kaninchen Nr. 1. Kontrollversuch. Nach der üblichen Behandlung wird das Tier katheterisiert und kein Diureticum gegeben. Es blieb praktisch während des ganzen Versuchs ruhig.

Nr. der Harnprobe	Zeitintervall	Menge ccm	Zucker im Blut Proz.	NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g
1	Blase	27,0		0,200	
2	10	0,9	0,104	0,266	0,0024
3	10	1,3		0,167	0,0022
4	10	2,0	0,104	0,063	0,0013
5	10	1,3		0,051	0,0007
6	10	0,5	0,108	0,055	0,0003
7	10	4,6		0,062	0,0029
8	10	2,6	0,127	0,053	0,0014
9	10	2,1		0,049	0,0010
10	10	3,4	0,125	0,042	0,0015
11	10	3,4		0,042	0,0015
12	10	0,2	0,134	0,056	0,0001
13	10	5,0		0,051	0,0026
14	10	3,3	0,129	0,048	0,0016
15	10	1,5		0,041	0,0006

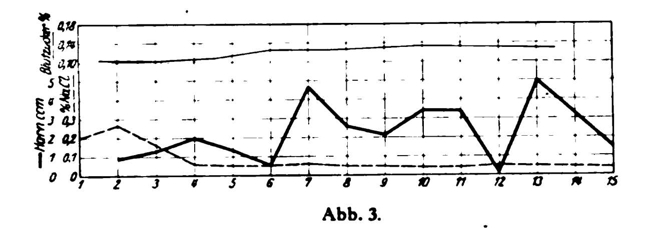


Abb. 3.

Euphyllininjektion an normalen Tieren.

Die zweite Reihe meiner Versuche beschäftigte sich zur Orientierung über die Wirkungsweise von Euphyllin an den nicht behufs Allergie vorbehandelten Tieren mit einer Wiederholung der Versuche, wie sie z. B. *Curtis* angestellt hat. Ich habe, um das kurz vorher zu nehmen, die gleichen Folgen der Euphyllininjektion beobachtet, wie sie *Curtis* beschrieben hat. Nur in einer Beziehung sind mir anscheinende, wie ich es bezeichnen möchte, Abweichungen von den *Curtis*schen Feststellungen begegnet. *Curtis* hatte angegeben, daß das erste, was nach Euphyllininjektion geschieht, ein Anstieg der Chloride des Blutes ist. Dieser Tatsache wegen, besonders aber auch deswegen, weil die Chloridablenkung in die Bauchhöhle die diuretische Wirkung von Euphyllin aufhob, hatte er den durch letztere Tatsache wohl gesicherten Schluß gezogen, daß der Elektrolytaustritt aus den Geweben in das Blut der primär bestimmende Faktor für die Wirkung auf die Niere sei. Nun habe ich in einer gewissen Anzahl von Fällen beobachten können, daß der primäre Anstieg der Chloride nicht so ausgesprochen war wie in den *Curtis*schen Versuchen, ja es konnte sogar gelegentlich eine Verminderung der Blutchloride konstatiert werden. Die nähere Analyse der einschlägigen Versuche führt jedoch, wie mir scheint, zu einer widerspruchsfreien Auf-

klärung des Tatbestandes. Es zeigt sich nämlich in diesen Fällen, daß die Chloridausscheidung durch die Niere teils infolge der Steigerung der Harnabsonderung, teils infolge der Chloridkonzentration im Harn so groß ist, daß die Chloridkonzentration im Blute nicht Schritt halten kann. Die rechnerische Auswertung ergibt ganz deutlich, daß während der ganzen Zeit Chloride aus den Geweben in das Blut in größeren Mengen übergetreten sein müssen. Es wird sich diese Tatsache namentlich aus Versuchen, über die ich im dritten Abschnitt meiner Arbeit berichten werde, ergeben.

Als Beispiele dieser Versuchsreihe gebe ich eine Übersichtstabelle, die über 13 Versuche berichtet.

Tabelle V.

Euphyllindiurese im normalen Zustande.

Versuchstier Nr.	Harnmenge ccm	Versuchsdauer Min.	Maximale 10-Minuten-Diurese	Gesamt-NaCl	Maximale NaCl-Proz. während Diurese
1	45,0	80	13,50	0,258	0,452
6	31,50	90	8,30	0,0246	0,211
1	56,1	100	8,7	0,238	0,590
6	22,7		14,6	0,142	0,744
6 doppelte Injektion	19,0	90	4,7	0,085	0,703
6	62,6	60	18,8	0,253	0,482
1	71,1		22,3	0,262	0,522
6	19,9	90	8	0,0396 Zucker im Harn	0,348
9	58,1	80	17,2	0,1033	0,561
10	46,7	130	7,1	0,2202	0,735
9	34,8	90	8,8 Euphyllinmenge	0,0376	0,292
9	21,2	100	6,0	0,0441	0,537
10	43,8	110	6,2 sehr verspätete protrahierte Diurese	0,1711	0,510

Schon ein Überblick über die maximalen 10-Minuten-Diuresen lehrt den großen Unterschied gegenüber den gesteigerten Diuresen ohne Injektion von Euphyllin. Der Durchschnittswert der maximalen 10-Minuten-Diuresen beträgt 11,1 ccm gegenüber 5,05 in der vorigen Reihe. Die maximalen Werte, die ich überhaupt in dieser Reihe beobachtet habe, betrugen 22,3 und 18,8 ccm. Sehr ausgesprochen ist die Wirkung auf die Chloride. Dies tut sich vor allem darin kund, daß die gesamte während der Beobachtungsdauer ausgeschiedene NaCl-Menge weit diejenige übertrifft, die ohne Injektion von Euphyllin beobachtet wurde. In der früheren Versuchsreihe handelte es sich um Milligramme und nur gelegentlich um wenige Zentigramme in Versuchsdauern von 1 bis 2 Stunden. In der vorliegenden Versuchsreihe konnten in viel kürzeren Perioden Dezigramme von NaCl ausgeschieden werden. Auch die Konzentrationsverhältnisse des NaCl während der Diurese nach Euphyllin lehrt die gesteigerte Ausscheidung von NaCl. Denn selbst, wenn während maximaler Ausscheidung von Wasser die Konzentration der Chloride im Harn gegenüber Perioden geringerer Wasserabsonderung sank, war das Sinken kein derartiges, daß es der Wassersteigerung entsprach.

Sehr belehrend ist in dieser Beziehung z. B. Versuch 32 vom 29. Januar 1926.

Tabelle VI.

Versuch 32. 29. Januar 1926. Kaninchen Nr. 9.

9h 03′	Kaninchen auf dem Operationstisch.
9 45	Kaninchen katheterisiert.
10 10	0,12 g Euphyllin.

Wegen andauernder Schwierigkeit beim Anlegen des Katheters strampelt das Tier fast konstant ½ Stunde lang. Blieb ruhig, nachdem der Katheter an Ort und Stelle war. Dies mag die erhöhte Lage der Blutzuckerkurve erklären.

Nr. der Harnprobe	Zeit-intervall	Menge ccm	Zucker im Blut Proz	Na Cl im Harn Proz.	Na Cl im Harn g	Zucker im Harn Proz.	Zucker im Harn g
1	Blase	9,5	0,184	0,124			
→ 2	10	3,0		0,066	0,0020		
3	10	12,9	0,152	0,047	0,0061		
4	10	16,6		0,104	0,0173		
5	10	17,2	0,150	0,223	0,0384		
6	10	3,1	0,182	0,358	0,0111		
7	10	1,9		0,500	0,0095		
8	10	1,4	0,197	0,547	0,0077		
9	10	2,0	0,209	0,561	0,0112		

Zucker in kleinen Mengen in Nr. 8 und 9.

Im Blasenharn vor dem Beginn des Versuchs betrug die NaCl-Konzentration im Harn 0,124. Sie sank im Anfang der Diurese auf 0,066 und 0,047 Proz., um im Maximum der Diurese, wo in 10 Min. 17,2 ccm Harn ausgeschieden wurden, auf 0,223 Proz. zu steigen. Sehen wir ganz ab von einer hypothetischen Erklärung von verminderter Rückresorption oder gesteigerter Sekretion, es bleibt der Tatbestand, daß in dieser Periode ein Mechanismus in Tätigkeit ist, der ein gesteigertes Verlassen von NaCl auf dem Wege der Niere erzwingt. Ein weiteres Beispiel, welches die gleichen Verhältnisse recht deutlich erkennen läßt, sei Versuch 12 vom 12. Sept. 1925. Der Blasenharn hatte die Konzentration an Chloriden 0,122 Proz. In der ersten 10-Minuten-Periode belief sie sich auf 0,039 Proz. Von dem Moment an, wo die Diurese einsetzt, steigt die Chloridkonzentration und erreicht, als die 10-Minuten-Absonderung den Wert von 22,3 ccm erreicht hat, den Betrag von 0,351 Proz. Während der nächsten halben Stunde hält die Diurese an und die Chloridkonzentration wächst weiter an. Vor Beginn der Diurese und während ihres größten Anstiegs hat sich auch im Blute der Prozentgehalt an Chloriden erhöht. Nächst der Wasser-

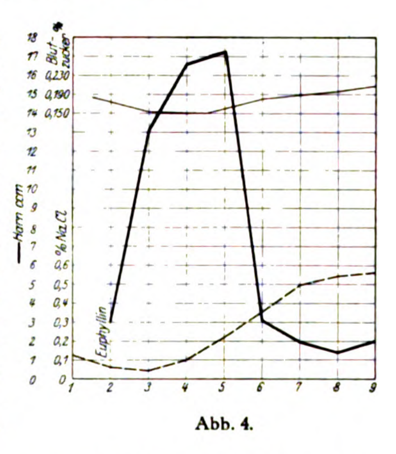


Abb. 4.

Tabe

Versuch

9h 10′ . . . . . . Kaninchen auf dem Operationstis
9 13 . . . . . . Kaninchen katheterisiert.
9 18 . 77,5 Proz. Hämoglobin.

Nr. der Harnprobe	Zeitintervall	Menge in ccm	NaCl im Blut Proz.	Chloride im Harn: NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g	Molare Konz. des NaCl = 5,85 Proz.	α der Harnchloride	Osmot. Konz. der Harnchloride	Harnstoff: Harnstoff im Harn Proz.	Harnstoff im Harn g	Molare Konzentration des Harnstoffs = 6 Proz.
1	Blase	26,0	0,480	0,122	0,0318	0,0242	0,9055	0,0461	0,593	0,1560	0,09
2	10	0,4	0,497	0,039	0,0002	0,0068			0,481	0,0019	0,08
3	10	1,9	0,488	0,142	0,0027	0,0243	0,9055	0,0461	0,558	0,0106	0,09
4	10	13,1	0,487	0,261	0.0341	0,0446	0,8820	0,0839	0,505	0,0662	0,08
5	10	22,3	0,500	0,351	0,0783	0,0600	0,8695	0,1122	0,090	0,0198	0,01
6	10	19,2	0,485	0,392	0,0754	0,0670	0,8645	0,1250	0,096	0,0170	0,01
7	10	8,6	0,476	0,466	0,0401	0,0796	0,8565	0,1478	0,133	0,0115	0,02
8	10	6,0	0,473	0,522	0,0313	0,0893	0,8506	0,1653	0,210	0,0126	0,03

Tab

Versuch

9h 05′ . . . . . . Kaninchen auf dem Operationstis
9 08 . . . . . . Kaninchen katheterisiert.
9 10 . 82,5 Proz. Hämoglobin.

Nr. der Harnprobe	Zeitintervall	Menge in ccm	NaCl im Blut Proz.	Chloride im Harn: NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g	Molare Konz. des NaCl = 5,85 Proz.	α der Harnchloride	Osmot. Konz. der Harnchloride	Harnstoff: Harnstoff im Harn Proz.	Harnstoff im Harn g	Molare Konzentration des Harnstoffs = 6 Proz.	Spez. el: Spez. elektr. Leitfähigkeit . 10^{-8}	Molare Lösung
1	Blase	12,5	0,516	0.051		0,0087	0,9337	0,0168	0.161		0,0268	132,32	0.14
2	10	0,1	0,501										
3	10	0,0											
4	10	3,0	0,511	0,563	0,017	0,0963	0,8357	0,1768	0,480	0,014	0,0800	169.42	0,1
5	10	14,6		0,597	0,087	0,1040	0,8383	0,1911	0,912	0,133	0.1520	139.99	0,1
6	10	3,3	0,498	0,744	0,025	0,1270	0,8249	0,2318	0,168	0,005	0,0280	143.99	0.16
7	10	1,1	0.493	0,760	0,008	0,1300	0,8232	0,2370	0,264	0,003	0,0440		
8	10	0.7		0,750	0.005	0.1282	0.8249	0,2340	0.287	0.002	0,0478		

II.

aninchen Nr. 1.

9h 40′ . . . . 0,12 g Euphyllin.
0 40 . . . . 78 Proz. Hämoglobin.
0 40 . . . . Versuch beendet.

Spez. elektr. Leitfähigkeit				Delta									
Spez. elektr. Leitfähigkeit . 10^{-8}	Molare Lösung als normal NaCl	α der voraufgehenden Lösung	Molekulare Konzentration = C_{elek}	Delta = Δ	Molare Konzentration = Δ:1,85 = C_0	Achloride = C_{achl}	$C_{elek}:C_0$ = Prozent Elektrolyte	$C_{achl}:C_{elek}$ = Prozent Achloride	Gesamtmoleküle im Harn	Anorganische Moleküle im Harn	Organische Moleküle im Harn	Konzentration der organischen Moleküle	Harnstoffmoleküle im Harn
130,30	0,146	0,823	0,2662	0,688	0,382	0,2201	69,7	83,2	0,0100	0,0069	0,0031	0,1158	0,0020
													0,0003
107,84	0,118	0,835	0,2165			0,1704		78,3		0,0004			0,0002
85,93	0,093	0,848	0,1719	0,425	0,230	0,0880	74,8	51,1	0,0030	0,0026	0,0004	0,0581	0,0011
64,79	0,069	0,867	0,1288	0,389	0,210	0,0166	61,5	12,9	0,0047	0,0029	0,0018	0,0812	0,0003
91,43	0,099	0,845	0,1826	0,446	0,241	0,0576	75,9	31,4	0,0046	0,0035	0,0011	0,0584	0,0003
111,88	0,124	0,832	0,2271	0,608	0,328	0,0793	66,2	34,9	0,0028	0,0020	0,0008	0,1009	0,0002
141,70	0,159	0,818	0,2891			0,1238		42,9		0,0017			0,0002

III.

aninchen Nr. 6.

9h 30′ . . . . 0,12 g Euphyllin.
0 30 . . . . . . 82,5 Proz. Hämoglobin.
0 30 . . . . Versuch beendet.

eitfähigkeit		Delta									
α der voraufgehenden Lösung	Molekulare Konzentration = C_{elek}	Delta = Δ	Molare Konzentration = Δ:1,85 + C_0	Achloride = C_{achl}	$C_{elek}:C_0$ = Prozent Elektrolyte	$C_{achl}:C_{elek}$ = Prozent Achloride	Gesamtmoleküle im Harn	Anorganische Moleküle im Harn	Organische Moleküle im Harn	Konzentration der organischen Moleküle	Harnstoffmoleküle im Harn
0,8168	0,2680	0,908	0,4908	0,2512	55,6	93,8	0,0614	0,0335	0,0279	0,2228	0,00335
0,8023	0,3455			0,1687		48,8		0,0010			0,00024
0,8132	0,2839	0,695	0,3756	0,0928	75,6	32,7	0,0055	0,0042	0,0031	0,0917	0,00174
0,8123	0,2925			0,0607		20,4		0,0010			0,00009
											0,00005
											0,00003

ausscheidung dominiert also die Chloridausscheidung. Die Achloride nehmen in der zweiten Periode der Diurese auch am Anstieg teil.

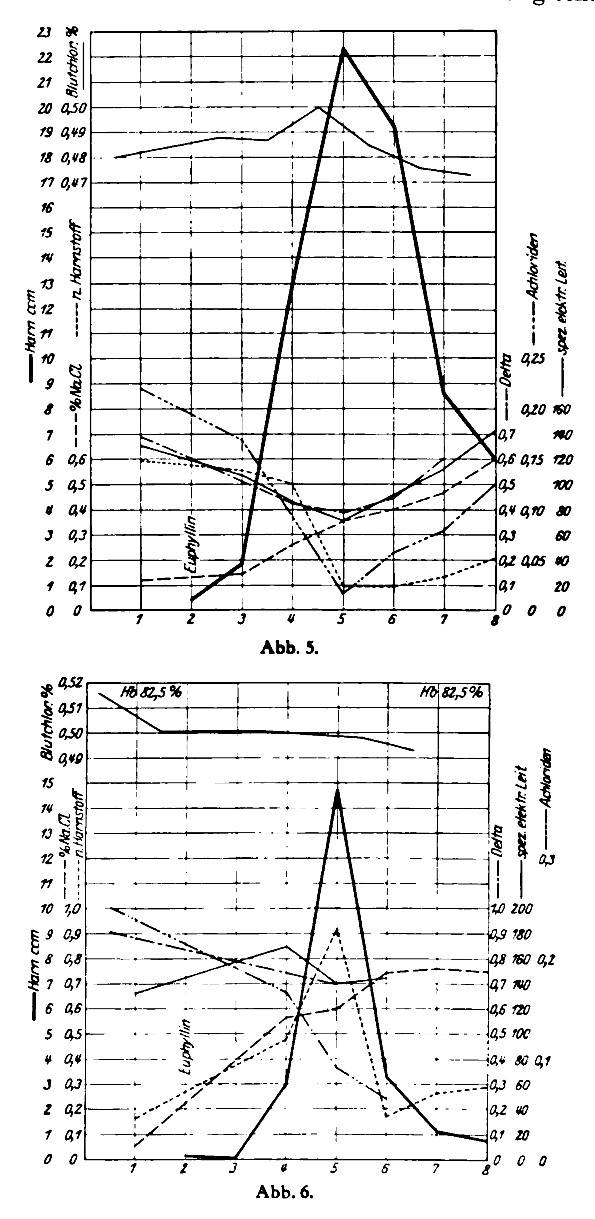


Abb. 5.

Abb. 6.

Es kann sogar vorkommen, daß während der Euphyllindiurese der Prozentgehalt Chloride im Harn den Prozentgehalt der Chloride im Blut übersteigt. Ein derartiges Beispiel findet sich in Versuch 8 vom 23. No-

vember 1925. Der natürlich abgesonderte Harn in der Blase enthielt nur 0,051 Proz. NaCl, sofort mit Beginn der Diurese steigt er auf 0,563 Proz., erreicht den Wert 0,597 Proz. bei der maximalen Diurese von 14,6, um dann bei allerdings abnehmender Diurese mit 0,744 Proz. schon den Chloridgehalt des Blutes zu übersteigen.

In einer gewissen Anzahl von Versuchen dieser Reihe habe ich auch meine Aufmerksamkeit auf den Zuckergehalt des Blutes und des Harns gerichtet. Die bekannte Hyperglykämie und auch Glykosurie nach Injektion eines spezifischen Diureticums habe ich in einer Anzahl von Versuchen feststellen können. Ich will hierauf im letzten Abschnitt eingehen.

Die Diurese im allergischen Zustande.

In diesem Hauptteile meiner Arbeit habe ich durch parenterale Injektion Kaninchen in den allergischen Zustand versetzt und habe die Wirkungsweise von Euphyllin, die mir am gleichen Tiere im Normalzustande durch Vorversuche bekannt war, geprüft. Zur Erzeugung von Allergie benutzte ich steriles Pferdeserum, sowie Kulturen von Typhusbazillen; beides wurde mir in liebenswürdiger Weise vom bakteriologischen Institut in Bern zur Verfügung gestellt. Ich habe die Mittel, welche den tierischen Organismus im Sinne der Allergie umstimmen sollten, einmal, zweimal und dreimal in variablen Zeitabständen subkutan, später auch intravenös injiziert und die Diureseversuche sowohl einige Stunden wie auch verschiedene Tage nach den stattgefundenen Injektionen ausgeführt. Irgend eine erhebliche äußere Reaktion der Tiere habe ich in keinem Falle beobachtet, namentlich auch keinen anaphylaktischen Schock. Derartige gröbere Veränderungen im tierischen Organismus wären auch nicht günstig gewesen, um Beziehung zwischen Umstimmungen des Körpers und einer nicht allzusehr von der Norm abweichenden Harnabsonderung analysieren zu können.

Anfänglich hatte ich projektiert, meine Untersuchungen nicht bloß auf Gefrierpunktserniedrigung, Leitfähigkeitsbestimmung, Chloridkonzentration, Achloridkonzentration auszudehnen, sondern auch auf den Harnstoffgehalt sowie auf einige andere N-haltige Bestandteile des Harns und des Blutes. Aber aus den Ergebnissen zahlreicher Vorversuche ging hervor, daß jedenfalls unter den Bedingungen meiner Versuche die Änderungen an den letztgenannten Bestandteilen derartig waren, daß sie keinen wesentlichen Aufschluß zu verheißen schienen, und ich werde daher nur die Ergebnisse an den erstgenannten Bestandteilen berücksichtigen. Nur das Verhalten des Zuckers darf nicht ganz außer acht gelassen werden. Die Mehrzahl meiner Versuche wurde angestellt mit Euphyllininjektion, jedoch habe ich eine ganze Reihe auch angestellt, ohne Euphyllin zu injizieren, um zu sehen, wie die unbeeinflußte Diurese im allergischen Zustande verläuft.

Bei der großen Variabilität der Erscheinungen der Diurese, wo jeder neue Eingriff die Variationsfähigkeit oft in bis jetzt unkontrollierbarer Weise zu steigern vermag, hat es sehr zahlreicher Versuche bedurft, um mir eine Einsicht in diejenigen Erscheinungen der Harnabsonderung zu gewähren, welche in einem einigermaßen regelmäßigen Zusammenhang mit der Umstimmung des Organismus durch parenterale Injektion körperfremder Eiweißstoffe zu stehen scheinen. Insbesondere erschien es erforderlich, das jeweilige Versuchsindividuum genau zu verschiedenen Zeiten und unter verschiedenen Bedingungen zu kennen. Durch Berücksichtigung



dieses methodisch wichtigen Punktes wird man weiter kommen als durch Häufung zahlreicher Einzelversuche an verschiedenen Tieren. Aus diesem Grunde will ich vorerst einige der wesentlichsten Befunde des Studiums der Harnabsonderung im allergischen Zustande an einem der von mir längere Zeit untersuchten Versuchsindividuen, nämlich Kaninchen Nr. 9, mit Hilfe von aus mehreren Versuchsreihen zusammengesetzten synthetischen Vergleichskurven zu illustrieren versuchen.

Abb. 7 gibt in ihrem unteren Abschnitt fünf Versuche über die Harnmengen bei dem normalen, im übrigen unbeeinflußten Tier. Der mittlere

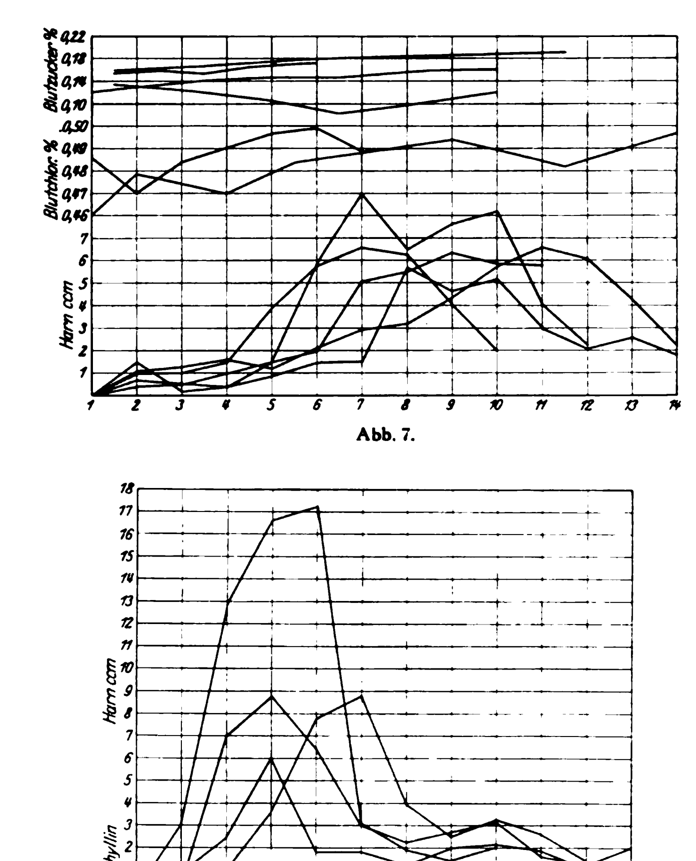


Abb. 7.

Abb. 8.

Abschnitt gibt in zwei Fällen den Verlauf der Blutchloridkonzentrationskurve, der oberste Abschnitt gibt den Verlauf der Blutzuckerkonzentrationskurve in vier Fällen. Ich habe gerade dieses Tier gewählt, weil es dasjenige ist, welches in einer ganzen Anzahl von Fällen unbeeinflußt bzw. nicht absichtlich beeinflußt eine größere Diurese gab, als sie allgemein für normal

betrachtet wird. Über die Gründe dieser größeren Diurese am anscheinend unbeeinflußten Tier habe ich mich im ersten Abschnitt meiner Arbeit ausgesprochen. Daß diese gesteigerte Diurese zum Teil mit einem vermehrten Elektrolytaustritt aus den Geweben in das Blut in Zusammenhang steht, geht aus dem mittleren Teil der Kurve hervor. Charakteristisch für den Verlauf der Diurese ist, daß dieselbe erst in den späteren Phasen des Versuchs sich ausbildet.

Das Bild wird anders in Abb. 8, welche die Harnmengen von vier Versuchen nach Injektion von Euphyllin darstellt, und zwar am gleichen Tier. Hier hat sich die Diurese auf den Anfangsteil verschoben, und zwar infolge der Euphyllininjektion, und die Maximalwerte können ganz erheblich größer sein als beim unbeeinflußten Tier.

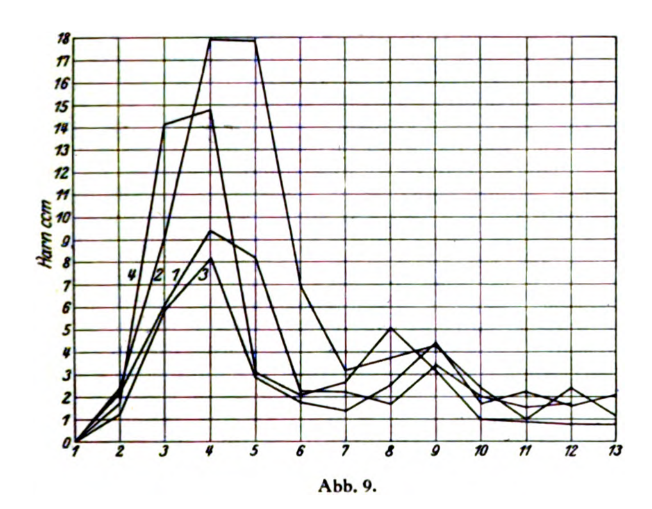


Abb. 9.

Abb. 9 gibt vier Versuche wieder am gleichen Tier nach Vorbehandlung mit Pferdeserum und nach Injektion von Euphyllin. Das gleiche prompte Eintreten der Diurese in den Anfangsteilen tritt hervor wie in der voraufgehenden Kurve, aber die Maxima können noch größer sein, und vor allem das Abklingen der Diurese ist viel allmählicher als in der voraufgehenden Reihe. Sodann, während bei bloßer Euphyllininjektion nach dem Abklingen der Diurese dieselbe im allgemeinen niedrig bleibt, kommt hier eine sekundäre Diurese im späteren Teile zum Durchbruch, wenn dieselbe auch nicht so groß ist wie in der gleichen Spätperiode beim unbeeinflußten Tier. Die Tatsache, welche aus diesen Vergleichskurven zum Ausdruck zu kommen scheint, ist die, daß beim allergischen Tier das Wasser nach Euphyllininjektion leichter und in größerer Menge aus den Geweben des Organismus mobilisierbar ist und deshalb in der geschilderten Art und Weise auf dem Wege der Niere den Organismus verläßt.

Damit sind aber die Tatbestände nicht erschöpft, was aus Abb. 10 und 11 bewiesen werden soll.

Der obere Abschnitt von Abb. 10 stellt den Prozentgehalt an NaCl im Harn des normalen unbeeinflußten Kaninchens in fünf Versuchen dar. Anfänglich kann der Chloridgehalt höher oder niedriger sein, aber in allen Fällen sinkt er auf ein niedriges gleichbleibendes Niveau herab. Der untere

Teil von Abb. 10 gibt vier Kurven gleicher Art, aber nach Injektion von Euphyllin. Deutlich kommt zum Ausdruck, daß infolge der Euphyllininjektion die Chloride in gesteigerter Konzentration die Niere verlassen.

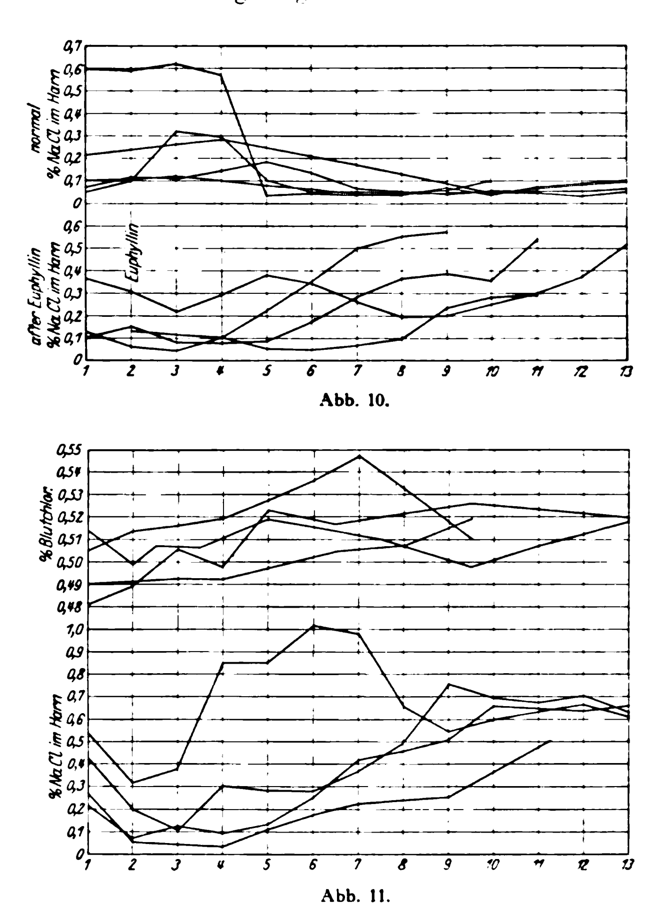


Abb. 10.

Abb. 11.

Abb. 11 ist eine synthetische Kurve aus Versuchen an Kaninchen 9 nach Erzeugung des allergischen Zustandes und Injektion von Euphyllin. Der untere Abschnitt gibt den Verlauf von Konzentrationskurven der Chloride im Harn. Die sehr wesentliche Erhöhung dieser Chloridkonzentration tritt deutlich hervor. Aus dem oberen Teile dieser Kurve, welche Blutchloridkonzentrationskurven enthält, ist der vermehrte Austritt der Chloride aus den Geweben und Übertritt in das Blut ersichtlich. Demnach werden unter dem Einfluß des allergischen Zustandes durch Euphyllin nicht bloß das Wasser, sondern auch die Elektrolyte viel leichter und stärker aus den Geweben mobilisiert. Hierin ist der Grund für die entsprechenden Verhältnisse der Ausscheidung durch die Niere zu suchen.

Anders wie die Elektrolyte verhält es sich bemerkenswerterweise mit dem Blutzucker. Ich habe nicht den Eindruck gewonnen, daß im allergischen

Zustande unter den von mir innegehaltenen Versuchsbedingungen Zucker leichter aus den Geweben mobilisiert wird. Ich möchte hierfür Abb. 12 anführen, gleichfalls von Versuchen an Kaninchen 9 stammend, in welcher der

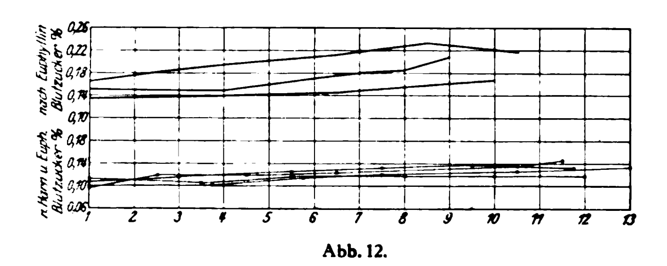


Abb. 12.

obere Teil Blutzuckerkonzentrationskurven am Normaltier nach Euphyllininjektion, während der untere Teil die gleichen Kurven nach Vorbehandlung mit Serum und nach Euphyllininjektion darstellen. Es ergibt sich nicht der geringste Anhaltspunkt dafür, daß im letzteren Falle das Blut sich mehr mit Zucker anreichert. Nachdem ich die Erfahrungen an einem Versuchsindividuum näher besprochen habe, gehe ich jetzt dazu über, die wesentlichsten Erscheinungen der Diurese im allergischen Zustande in zusammenfassender Weise zu betrachten. Hierzu diene die Tabelle IX, in welcher ich die wesentlichen in Betracht kommenden Daten von vier meiner Versuchstiere so zusammengestellt habe, daß die Harnabsonderung im Normalzustand, im Normalzustand und nach Euphyllininjektion, und schließlich im allergischen Zustande bei gleichzeitiger Euphyllininjektion erkennbar ist. Bei zwei von den Versuchstieren ist noch eine Rubrik aufgenommen, welche die Verhältnisse der Harnabsonderung im allergischen Zustande, aber ohne Injektion von Euphyllin darstellt.

Um mit dem letzteren zu beginnen, so zeigt sich, daß im allergischen Zustande auch eine Euphyllininjektion die pro Stunde durchschnittlich ausgeschiedene Harnmenge größer ist als die im normalen, unbeeinflußten Zustande. Sie kann sogar so groß sein, daß, wenigstens bei dem einen Versuchstier, das Hinzufügen der Euphyllininjektion die Größe der Wasserabsonderung nicht mehr beeinflußt. Daraus geht hervor, daß im allergischen Zustande an und für sich das Wasser leichter mobilisierbar geworden ist. Zu dieser Folgerung ist man übrigens auch durch andere Erfahrungen gelangt, z. B. durch das Studium der Lymphbildung und das Studium von Krankheitszuständen, die man als allergischer Natur auffaßt. Man findet hierüber instruktives Material in der Monographie von *Meyer-Bisch*[1]). Das am meisten in die Augen springende Resultat ergibt sich bei Betrachtung der Ausscheidungsverhältnisse des NaCl. Namentlich bei einer Art der Darstellung wird dieselbe besonders offenkundig. Ich habe nämlich eine Berechnung der während einer Stunde ausgeschiedenen durchschnittlichen prozentischen Menge des im Blute der Tiere vorhandenen NaCl aufgestellt. Hierbei ergibt sich, daß in jedem Falle im allergischen Zustande und nach Euphyllininjektion ein weit größerer Bruchteil des im Gesamtblut vorhandenen Kochsalzes auf dem Wege der Niere den Organismus verläßt. Bei Kaninchen Nr. 9 ist im normalen Zustande der Wert 1,34 Proz., nach

[1]) *Meyer-Bisch*, Ergebn. d. Physiol. 25, 574, 1926.

Tab

Benutzte Tiere:		Nr. 9		
		Normal	Nach Euphyllin	Na[c]h Seru[m] Euph[yllin]
Versuchsnummer:		4	3	4
Durchschn. Harnmenge pro 10-Min.-Periode vor d. Diurese	ccm	1,1		
Minimale Harnmenge pro 10-Min.-Periode während der Diurese	„	5,7	6,0	8.2
Maximale Harnmenge pro 10-Min.-Periode während der Diurese	„	9,0	17,9	17.9
Durchschnittliche Harnmenge in 1 Stunde ausgeschieden	„	30,4	38,2	39.1
„ Proz. NaCl im Blasenharn		0,189	0,196	0,3
„ „ „ „ Harn vor der Diurese		0,230	0,166	0,1
Minimale Proz. NaCl im Harn während der Diurese		0,039	0,110	0,1
Maximale „ „ „ „ „ „ „		0,059	0,412	0,6
Durchschn. „ „ „ „ „ „ „		0,056	0,217	0.4
„ Menge NaCl während 1 Stunde ausgeschieden	g	0,0152	0,0520	0,1
„ „ „ im Tierblut während 1 Stunde ausgeschieden	g	1,34	6,41	10,0
Minimale Proz. Zucker im Harn während der Diurese		0,0	0,14	0,0
Maximale Proz. Zucker im Harn während der Diurese		0,0	0,62	0,0
Durchschn. Proz. Zucker im Harn während der Diurese		0,0	0,44	0,0
Minimale Veränderung im Blutchlorid	Proz.	0,027	—	0.0
Maximale Veränderung im Blutchlorid	„	0,027	—	0,0
Durchnittl. Veränderung im Blutchlorid	„	0,027	—	0,0
Minimale Veränderung im Blutzucker	„	0,018	0,034	0,0
Maximale Veränderung im Blutzucker	„	0,051	0,068	0,0
Durchschn. Veränderung im Blutzucker	„	0,037	0,052	0,0

Euphyllin 6,41 Proz., im allergischen Zustande und nach Euphyllin aber 10 Proz. Bei Kaninchen Nr. 10 ist der Wert im Normalzustande 1,16 Proz., nach Euphyllin 8,37 Proz., und im allergischen Zustande und nach Euphyllin 9,51 Proz.

Ein recht instruktives Beispiel für den großen Einfluß des allergischen Zustandes möchte ich aus denjenigen meiner Versuche bringen, wo ich körperfremdes Eiweiß intravenös injiziert habe. Ich entnehme dieses Beispiel aus den Versuchsreihen, die an Kaninchen Nr. 10 ausgeführt wurden. Dieses Tier erhielt 18 Tage nach der ersten und 11 Tage nach der zweiten Injektion, intramuskulär, von Pferdeserum eine intravenöse Injektion von 0,2 ccm Pferdeserum. 3 Minuten nach der Injektion zeigten sich leichte Andeutungen von krampfähnlichen Bewegungen, aber keine respiratorischen Störungen. Während der ganzen übrigen Versuchszeit blieb das Tier sehr ruhig. 1 Stunde nach der intravenösen Injektion wurde Euphyllin intramuskulär gegeben. Die darauf folgende Diurese war prompt und stark, innerhalb 40 Minuten wurden 45,2 ccm Harn abgesondert. Innerhalb 20 Minuten nachdem Euphyllin gegeben worden war, stieg der prozentische Chlorgehalt des Harns von 0,175 auf 1,159 Proz., und in der gleichen Zeit erhöhte sich die Harnmenge während einer 10-Minuten-Periode von 0,9 auf 18,4 ccm. Während der ersten 50 Minuten nach der Injektion von Euphyllin wurden 0,397 g Chloride als Natriumchlorid berechnet im Harn ausgeschieden. Dies stellt 36,8 Proz. des Gesamtnatriumchlorids im Blute des Tieres dar. Der Prozentgehalt der Chloride im peripheren Blute blieb während dieser Zeit praktisch konstant, woraus man natürlich folgern muß, daß ein entsprechender Einstrom aus den Geweben in das Blut stattfindet.

IX.

Nr. 10			Nr. 1				Nr 6			
Normal	Nach Euphyllin	Nach Serum u. Euphyllin	Normal	Nach Euphyllin	Nach Eiweiß	Nach Eiweiß u. Euphyllin	Normal	Nach Euphyllin	Nach Eiweiß	Nach Eiweiß u. Euphyllin
4	2	3	1	3	1	1	2	2	1	2
[illegible]			1,2	1,2	1,5	0,7	0,6	0,4	1,2	0,8
[illegible]	6,2	4,1					2,5	8,0		7,5
[illegible]	7.1	14,6	5,0	22,3	9,9	16,8	9,1	18,8	10,0	16,8
[illegible]	23,6	36,8	18,7	47,4	43,3	43,2	27,5	39,0	37,4	43,5
[illegible]	0.422	0,494	0,200	0,070	0,128	0,496	0,063	0,080	0,306	0,179
[illegible]	0.432	0.220	0,120	0,082	0,102	0,476	0,191	0,067	0,210	0,076
[illegible]	0,308	0,310	0,042	0,055	0,085	0,753	0,074	0,238	0,188	0,296
[illegible]	0.548	0,531	0,062	0,540	0,679	1,300	0,146	0,358	0,389	0,778
[illegible]	0.386	0,405	0,051	0,349	0,258	1,070	0,105	0,299	0,299	0,523
[illegible]	0,0955	0,1061	0,0084	0,1951	0,084	0,3880	0,0088	0,1470	0,1060	0,1780
[illegible]	8.37	9,51	1,20	24,38	8,04	48,77	2,37	2,57	9,14	15,32
[illegible]	0,040	0,090	0,0	0,18	0,0	0,14	0,0	0,09	0,0	0,09
[illegible]	2.18	2.12	0,0	4,39	0,0	0,52	0,0	0,98	0,0	1.20
[illegible]	0,25	0,38	0,0	1,52	0,0	0,36	0,0	0.45	0,0	0,59
[illegible]	—	0,020	—	—	—	—	0,012	0,028	—	0,045
[illegible]	—	0,032	—	—	0,071	0,041	0,028	0,029	0,050	0,063
[illegible]	—	0,026	—	—	—	—	0,020	0,028	—	0,054
[illegible]	0.154	0,065	—	—	—	—	0,025			0,061
[illegible]	0,166	0,166	0,030	0,116	0,053	0,090	0,097	0,158	0,025	0,137
[illegible]	0,166	0,098					0,066			0,099

Weil mir daran lag, möglichst schonend bei meinen Versuchen zu verfahren, sind unter meinen zahlreichen Versuchen über den allergischen Zustand diejenigen, bei denen eine intravenöse Injektion von körperfremdem Eiweiß gemacht wurde, die Minderzahl. Nichtsdestoweniger treten gerade bei diesen die in Betracht kommenden Erscheinungen sehr prägnant hervor. Zur Veranschaulichung seien zwei Protokolle und Kurven gebracht. Versuch 53 vom 19. Februar 1926, Tabelle X und Abb. 13, sowie Versuch 54 vom 20. Februar 1926, Tabelle XI und Abb. 14. Ich bespreche zunächst den letzteren Versuch, weil in demselben nur eine Injektion von 0,3 ccm Typhusbazillensuspension gemacht wurde. Sofort nach der Injektion kommt es zu einer immerhin merklichen Steigerung der Diurese, die aber bald abklingt. Aber 80 Minuten nach der Injektion kommt es zu einer dauernd ansteigenden Diurese von einer derartigen Größe und Andauer, daß sie unbedingt mit den experimentell geschaffenen Bedingungen zusammenhängen muß. Schließlich sind in 180 Minuten nicht weniger als 80,2 ccm Harn abgesondert worden. Auch die Menge Chloride, die im Harn ausgeschieden werden, ist nicht unbeträchtlich, wenngleich nicht so groß wie bei den Versuchen mit Injektion von Euphyllin. Im Blute steigt der Chloridgehalt fast ununterbrochen an. Der Zuckergehalt des Blutes ändert sich nicht wesentlich, der Harn war stets zuckerfrei. Man kann den Verlauf der Harnabsonderung als einen phasischen bezeichnen, und dieser phasische Ablauf der Diurese ist mir so oft gerade im allergischen Zustande begegnet, daß ich ihn als charakteristisch bezeichnen möchte. Phasisch ist auch der Ablauf in dem zweiten Versuch, Nr. 53, wo außer der intravenösen Injektion von 0,3 ccm Suspension von Typhusbazillen 9 Minuten später Euphyllin

injiziert wurde. Eine rasche und gewaltige Diurese setzt ein, die abklingt, aber weit über die Norm erhöht bleibt und mit zwei weiteren Diuresesteigerungen phasisch verläuft. Der Diurese geht eine merkliche Steigerung des Chloridgehalts im Blute vorauf, und dauernd wächst der Chloridgehalt des Blutes. Dementsprechend verläßt auch in gesteigerter Menge NaCl den Organismus durch die Niere. Der Zuckergehalt im Blute steigt dauernd an, und in den späteren Phasen des Versuchs kommt es zu einer merklichen Glykosurie.

Tabelle X.

Versuch 53. 19. Januar 1926. Kaninchen Nr. 6.

2h 34' . . . . Kaninchen auf dem Tisch.
2 40 . . . . Kaninchen katheterisiert.
2 51 . . . . 0,3 ccm Suspension von Typhusbazillen intravenös.
3 : 30 . . . . 0,12 g Euphyllin.

Nr der Harnprobe	Zeit-intervall	Menge ccm	Zucker im Blut Proz.	NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g	Zucker im Harn Proz.	Zucker im Harn g	NaCl im Blut Proz.	Temperatur °C
1	Blase	61,0	0,108	0,041	—				38,3
Typhusb.									
→ 2	10	0,6		0,043	0,0003				
3	10	1,2		0,056	0,0007			0,487	
4	10	1,8		0,051	0,0009				
5	10	3,5	0,165	0,040	0,0014				38,3
Euphyllin									
→ 6	10	5,0		0,038	0,0019			0,519	
7	10	8,9		0,076	0,0068			0,517	
8	10	16,8	0,150	0,137	0,0230				
9	10	20,4		0,181	0,0370			0,513	
10	10	5,5	0,190	0,253	0,0139			0,525	38,9
11	10	3,3		0,244	0,0081			0,521	
12	10	4,8	0,208	0,259	0,0124				38,9
13	10	7,1		0,271	0,0192	0,09	0,0064	0,526	
14	10	4,1		0,259	0,0106	0,22	0,0090		
15	10	2,4	0,257	0,227	0,0055	0,42	0,0161		
16	10	6,3		0,207	0,0130	0,67	0,0422	0,550	
17	10	5,8		0,212	0,0123	0,67	0,0388		
18	10	5,5	0,245	0,231	0,0127	0,67	0,0735		38,5
19	10	5,4		0,249	0,0134				
20	10	5,2		0,413	0,0215	0,76	0,0395		
21	10	2,0		0,524	0,0105	1,20	0,2040	0,540	

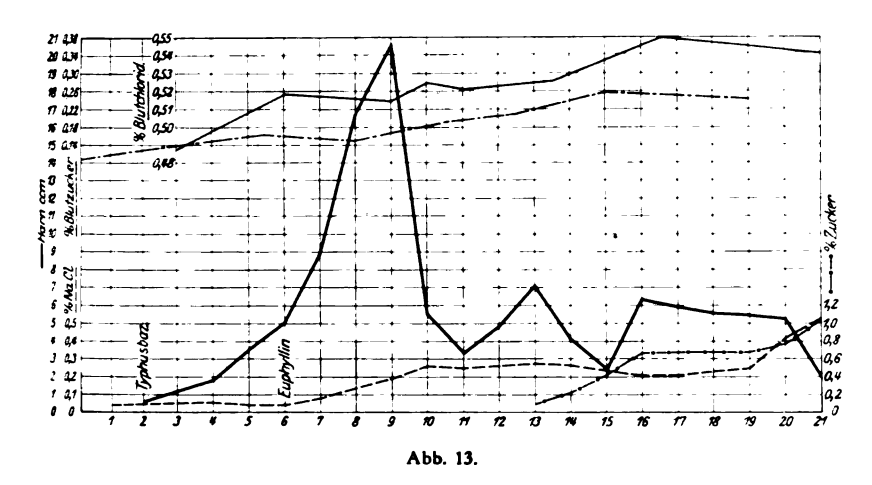


Abb. 13.

Tabelle XI.

Versuch 54. **20. März 1926. Kaninchen Nr. 1.**

3h 10' . . . . Kaninchen auf dem Tisch.
3 16 . . . . Kaninchen katheterisiert.
3 35 . . . . 0,3 ccm Typhussuspension intravenös.

Das Tier bleibt praktisch während des ganzen Versuchs ruhig. Zustand der Blutgefäße, Blutung usw. wie in Versuch 53.

Nr. der Harnprobe	Zeit-intervall	Menge ccm	Zucker im Blut Proz.	NaCl im Blut Proz.	NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g	Zucker im Harn Proz.	Zucker im Harn g	Temperatur °C
1	Blase	66,0	0,093	0,492	0,128	—			38,3
→ 2	10	1,7		0,484	0,102	0,0017			
3	10	1,6	0,122		0,103	0,0017			
4	10	4,6		0,483	0,121	0,0056			
5	10	2,2			0,121	0,0027			38,7
6	10	2,4	0,122	0,571 (?)	0,301	0,0072			
7	10	1,7			0,483	0,0082			38,9
8	10	1,5		0,527	0,582	0,0087			
9	10	1,6	0,115		0,639	0,0102			
10	10	2,0		0,513	0,679	0,0136	Keiner	Keiner	39,2
11	10	2,4	0,132	0,525	0,621	0,0149			
12	10	4,0			0,430	0,0172			39,1
13	10	5,8	0,146		0,286	0,0166			
14	10	7,1		0,538	0,166	0,0118			
15	10	8,2			0,121	0,0099			
16	10	8,4			0,108	0,0091			
17	10	9,9		0,554	0,0981	0,0097			
18	10	8,6			0,085	0,0073			
19	10	4,6			0,121	0,0056			
20	10	3,6			0,127	0,0046			39,1

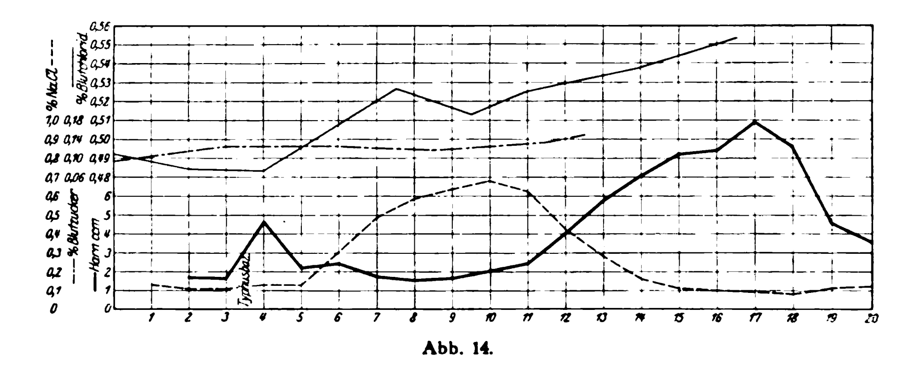


Abb. 14.

Was so prägnant in den beiden letzten Versuchsbeispielen erkenntlich war, tritt aber auch in dem auf mildere Weise erzeugten allergischen Zustande auf. Um nicht zu viel Platz in Anspruch zu nehmen, will ich nur ein einziges Beispiel bringen, nämlich Versuch 49 vom 15. Februar 1926, in welchem 5 Tage nach der ersten Injektion von Pferdeserum der Verlauf der Diurese nach Euphyllininjektion beobachtet wurde.

Tabelle XII.

Versuch 49. 15. Januar 1926. Kaninchen Nr. 9.

2h 18′ . . . . Kaninchen auf dem Tisch.
2 25 . . . . Kaninchen katheterisiert.
2 40 . . . . 0,12 g Euphyllin.

5 Tage nach der ersten Injektion von Pferdeserum. Das Tier bewegte sich mäßig beim Einführen des Katheters und nur selten nachher.

Nr. der Harnprobe	Zeitintervall	Menge ccm	Na Cl im Blut Proz.	Zucker im Blut Proz.	Na Cl im Harn Proz.	Na Cl im Harn g	Zucker im Harn Proz.
1	Blase	41,2	0,481	0,097	0,213	—	
2	10	2,4	0,489	0,119	0,068	0,0016	
3	10	9,2	0,506		0,126	0,0116	
4	10	17,9	0,498	0,119	0,094	0,0168	
5	10	17,9	0,523		0,136	0,0243	
6	10	7,0			0,259	0,0181	
7	10	3,2	0,517	0,125	0,421	0,0135	Keiner
8	10	3,8	0,485		0,460	0,0175	
9	10	4,3		0,134	0,510	0,0220	
10	10	2,4	0,526		0,657	0,0158	
11	10	1,0			0,647	0,0065	
12	10	2,4		0,145	0,637	0,0153	
13	10	1,1	0,520		0,663	0,0073	

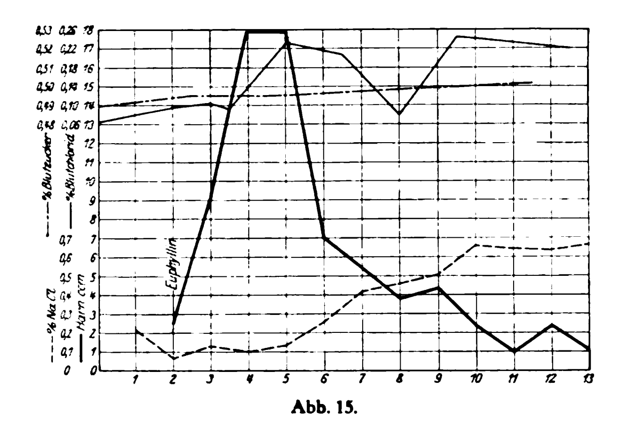


Abb. 15.

Die prompte und gewaltige Diurese, die Mobilisierung und Ausscheidung der Chloride hat einen sehr ähnlichen Typus wie in den beiden voraufgegangenen Versuchen.

Die zusammenfassende Tabelle XIII soll nochmals in einer etwas anderen Weise den Verlauf der Diurese im allergischen Zustande darstellen, indem je zwei Versuchsreihen an Kaninchen Nr. 1 und 6 protokolliert sind. Der Vergleich besteht in beiden Fällen in dem Verlauf der Diurese nach bloßer Injektion von körperfremdem Eiweiß (Suspension von toten Typhusbazillen) und dem Verlauf der Diurese nach der gleichen Injektion und nachfolgender Euphyllininjektion. Die bloße Injektion von Vaccinen veranlaßte ein Steigen der Blutchloride und eine vermehrte Ausscheidung von Chloriden im Harn. Wenn Euphyllin etwa 1 Stunde nach Injektion der Vaccine injiziert wurde, war der Zuwachs der Blutchloride nicht über denjenigen erhöht, der nach Injektion körperfremden Eiweißes beobachtet wurde. Aber die im Harn ausgeschiedene Chlormenge war dreimal größer als nach Injektion von Eiweiß allein. In einer früheren Zusammenstellung wurde gezeigt, daß die Chloridausscheidung bei den gleichen Tieren nach bloßer Injektion von Euphyllin nur etwa halb so groß als diejenige nach Injektion körperfremden Eiweißes und von Euphyllin war. Nach der Injektion des körperfremden Eiweißes übertraf die Größe der in diesen Fällen beobachteten Diurese nicht diejenige im normalen Zustande. Aber der Prozentgehalt an Chloriden im Harn hielt sich auf einem höheren Niveau als bei der normalen Diurese. In den hier berichteten Versuchen fiel mit der maximalen Diurese, die auf die Injektion von körperfremdem Eiweiß und Euphyllin folgte, auch die maximale Ausscheidung der Chloride zusammen. Diese Beobachtung wie auch zahlreiche meiner anderen Versuche weisen darauf hin, daß im allergischen Zustande nach Injektion körperfremden Eiweißes eine gesteigerte Permeabilität der Gewebe für Chloride und vermutlich für die Elektrolyte überhaupt stattfindet, und daß nach intramuskulärer Injektion von Euphyllin besonders die Permeabilität der Niere für Chloride gesteigert wird. Hier ist zum ersten Male die Rede von einer gesteigerten Permeabilität der Niere. In den früheren Arbeiten führten die tatsächlichen Beobachtungen nur zu dem Schluß, daß Euphyllin einen Einfluß auf die Permeabilität der Gewebe im allgemeinen habe, und speziell *Nakao* glaubte beim Kaninchen als wesentlichsten Sitz der Permeabilitätsverminderung die Unterleibseingeweide erkennen zu können. Nun gehört

Tabelle XIII.

Nr. der Harnprobe	Zeitintervall	Kaninchen Nr. 1								Kaninchen Nr. 6							
		Nach Eiweiß				Nach Eiweiß und Euphyllin				Nach Eiweiß				Nach Eiweiß und Euphyllin			
		Harnmenge ccm	Blutchlor Proz.	NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g	Harnmenge ccm	Blutchlor Proz.	NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g	Harnmenge ccm	Blutchlor Proz.	NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g	Harnmenge ccm	Blutchlor Proz.	NaCl im Harn Proz.	NaCl im Harn g
1	Blase	66,0	0,492	0,128		10,0	0,525	0,496		62,0	0,533	0,306		96,0	0,529	0,318	
2 →	10	1,7	0,484	0,102	0,0017	→ 0,7		0,536	0,0038	1,9		0,287	0,0055	→ 5,1	0,518	0,108	0,0055
3	10	1,6		0,103	0,0017	0,6	0,512	0,533	0,0032	→ 1,4	0,523	0,159	0,0022	7,4		0,093	0,0069
4	10	4,6	0,483	0,121	0,0056	0,8		0,324	0,0026	2,9		0,048	0,0014	6,6	0,552	0,139	0,0092
5	10	2,2		0,121	0,0027	0,6		0,329	0,0020	1,7	0,570	0,040	0,0007	7,5		0,121	0,0091
6	10	2,4		0,301	0,0072	0,6		0,600	0,0036	0,8		0,150	0,0012	0,8	0,556	0,217	0,0017
7	10	1,7		0,483	0,0082	0,8	0,533	0,508	0,0041	1,1		0,242	0,0027	→ 1,5		0,526	0,0079
8	10	1,5	0,527	0,582	0,0087	0,6		0,502	0,0030	1,4		0,310	0,0043	4,1	0,560	0,866	0,0355
9	10	1,6		0,639	0,0102	→ 1,8	0,533	1,067	0,0192	3,7		0,387	0,0143	7,5		0,900	0,0675
10	10	2,0	0,513	0,679	0,0136	9,8		0,900	0,0882	6,5	0,573	0,389	0,0252	3,4		0,962	0,0327
11	10	2,4		0,621	0,0149	16,8		0,753	0,1264	9,5		0,309	0,0293	2,8	0,561	1,031	0,0289
12	10	4,0	0,525	0,430	0,0172	8,3	0,497	0,930	0,0772	10,0		0,213	0,0213	4,3		1,018	0,0438
13	10	5,8		0,286	0,0166	3,5	0,504	1,098	0,0384	5,4		0,188	0,0102	5,1		0,890	0,0455
14	10	7,1	0,538	0,166	0,0118	3,1		1,232	0,0383	2,5		0,228	0,0057	3,7		0,811	0,0300
15	10	8,2		0,121	0,0099	1,7		1,300	0,0221	1,5		0,376	0,0057	5,1	0,570	0,919	0,0469
16	10	8,4		0,108	0,0091	2,4	0,509	1,274	0,0306					5,6		0,898	0,0502
17	10	9,9	0,554	0,098	0,0097									5,7		0,922	0,0525
18	10	8,6		0,085	0,0073									1,5		1,008	0,0151
19	10	4,6		0,121	0,0056									1,0	0,563	1,062	0,0106
20	10	3,6		0,127	0,0046												
Total g NaCl			(16 Perioden)		0,1391				0,4627		(15 Perioden)		0,1297				0,3711
Max. Variation Proz. Blutchlor			0,071				0,036				0,050				0,052		

aber die Niere selbst zu den Körpergeweben, weshalb in den Arbeiten des Berner physiologischen Instituts Nachdruck darauf gelegt wurde, die Variabilität der Permeabilität der Nierenzellen selbst nicht außer acht zu lassen. Aber erst in den vorliegenden Versuchen scheinen sich Anhaltspunkte dafür zu finden, daß tatsächlich unter dem kombinierten Einfluß des allergischen Zustandes und der Euphyllininjektion die Permeabilität der Niere für Elektrolyte gesteigert sei. Trotzdem die von mir in zahlreichen Versuchen beobachteten Tatsachen am meisten zugunsten dieser Auffassung sprechen, erscheinen mir doch weitere, speziell auf die Permeabilitätsverhältnisse der Niere gerichtete Versuche wünschenswert.

Bestimmtere Anhaltspunkte über die Permeabilität der Niere ergeben sich, wenn man die Ausscheidung des Zuckers im Harn ohne und nach Euphyllininjektionen etwas genauer studiert. Zur Veranschaulichung des Sachverhalts bringe ich Tabelle XIV.

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich, daß unter dem Einfluß von Euphyllin schon Zucker im Harn ausgeschieden wird, wenn der Blutzuckergehalt zwischen 0,20 und 0,22 liegt, während Tiere ohne Euphyllininjektion selbst Blutzuckerkonzentrationen von 0,27 Proz. haben können, ohne Zucker im Harn auszuscheiden. In anderen Versuchen, welche zum Teil in meiner ersten zusammenfassenden Tabelle sich vorfinden, zeigt sich, daß nach Euphyllininjektionen Zucker im Harn schon bei so niedrigen Blutzuckerkonzentrationen wie 0,17 Proz. auftreten kann. Auf Grund meiner Beobachtungen glaube ich sagen zu können, daß nach Euphyllininjektion durchschnittlich bei einer Blutzuckerkonzentration zwischen 0,17 bis 0,21 Proz. Zucker im Harn auftritt.

Tabelle XIV.

Harnprobe Nr.	Kaninchen Nr. 10							Kaninchen Nr. 6					
	Ohne Euphyllin				Nach Euphyllin			Ohne Euphyllin			Nach Euphyllin		
	Zeit-intervall	Harnmenge ccm	Blutzucker Proz.	Zucker im Harn Proz.	Harnmenge ccm	Blutzucker Proz.	Zucker im Harn Proz.	Harnmenge ccm	Blutzucker Proz.	Zucker im Harn Proz.	Harnmenge ccm	Blutzucker Proz.	Zucker im Harn Proz.
1	Blase	29,0	0,145		76,0	0,110		62,0	0.127		23,0	0,122	
2	10	0,7			→0,7			0,5	0,177		→0,3	0,157	
3	10	1,0	0,145		2,0	0,160		0,7			2,6		
4	10	0,1			3,5	0,190		0,7			8,0		
5	10	2,1	0,228		2,8	0,222		0,7	0,224		3,0	0,211	
6	10	0,6	0,236		3,0		0,04	1,1			1,2		0,09
7	10	0,7	0,251	Keiner	3,2	0,240	0,12	1,8		Keiner	1,0		0,14
8	10	0,1	0,266		3,4		0,18	5,0	0,206		0,9	0,262	0,27
9					4,2	0,260	0,27	8,4			1,0		0,53
10					3,7		0,23	9,1			1,3	0,280	0,68
11					5,9	0,276	0,42	8,7	0.173		0,9		0,98
12					5,9		0,47	9,0					
12					6,2		0,67	3,7	0,155				

Die in dieser Tabelle befindlichen Zahlen gewinnen eine größere Bedeutung, wenn ich sie mit den in meinen zahlreichen Versuchen an verschiedenen Tieren beobachteten Veränderungen im Blutzuckergehalt in Beziehung setze. Aufgebundene Kaninchen können bekanntlich eine Er-

höhung des Blutzuckers infolge des Aufbindens zeigen, und die Größe der Steigerung der Zuckerkonzentration hängt teilweise von dem geleisteten Widerstand ab. Ich habe namentlich bei noch nicht gewöhnten Tieren Erhöhungen der Blutzuckerkonzentration um 0,09 Proz. beobachtet. Sobald die Tiere an die Bedingungen meiner Versuche gewöhnt waren, war die Erhöhung des Blutzuckers meist gering. Glykosurie war hingegen selbst dann, wenn ich künstlich für eine dauernde Unruhe des Tieres sorgte, entweder gar nicht vorhanden oder nur gering. Sobald aber Euphyllin injiziert wurde, trat, falls eine Vermehrung des Blutzuckers selbst geringeren Grades stattgefunden hatte, Zucker in den Harn über. Es scheint mir aus diesen oft von mir gemachten Beobachtungen zu folgen, daß Euphyllin die Permeabilität der Nierenzellen für Zucker vermehrt. Die voraufgegangenen Arbeiten hatten zu den Schluß geführt, daß der wesentlichste Angriffspunkt des Euphyllins in den Geweben gelegen sei und daß die Annahme, daß Euphyllin ein spezifisches Reizmittel für die Nierenzelle im Sinne einer sekretorischen Theorie sei, überflüssig ist. Diese Erkenntnis gründete sich auf die Betrachtung der Ausscheidungsverhältnisse von Wasser und Elektrolyten. Anders steht es jedoch, wie ich gezeigt habe, wenn man die Verhältnisse des Zuckers in Rücksicht zieht. Ich möchte nicht so weit gehen, zu behaupten, daß Euphyllin einen Reiz auf die Nierenzelle ausübt, welcher sie zu einer vermehrten Ausscheidung von Zucker veranlaßt. Ich möchte mich darauf beschränken, von gesteigerter Permeabilität der Nierenzelle für Zucker zu reden und will auch die Diskussion hinsichtlich Ausscheidung oder Rückresorption wegen hierfür mangelnder experimenteller Grundlagen außer Betracht lassen.

Der allergische Zustand hatte in keiner Phase einen erkennbaren Einfluß auf die Ausscheidung des Zuckers; nur Euphyllin hat einen solchen. Wir haben gesehen, daß hinsichtlich des Wassers und der Elektrolyte es sich ganz anders verhält.

Zusammengefaßt, ist der wesentliche Inhalt meiner Arbeit der nachfolgende:

1. Voraufgegangene Arbeiten hatten gezeigt, daß der wesentlich bestimmende Faktor für die Größe der Diurese, insbesondere derjenigen nach einem spezifischen Diureticum, der Stoffaustausch zwischen Blut und Geweben ist, solange die Versuche unter möglichst physiologischen Bedingungen angestellt wurden. Diese Vorstellung wurde durch eine größere Reihe von Versuchen erneut bestätigt.

2. Aus einer größeren Reihe von bloßen Kontrollversuchen ergab sich, daß eine Reihe von physiologischen Variablen ohne jeden Eingriff zu einer merklichen Diurese führen können.

3. Der Vergleich dieser Diurese mit der durch Euphyllin hervorgerufenen zeigte erhebliche quantitative und qualitative Unterschiede.

4. Um den Einfluß des wechselnden Verhaltens der Gewebe auf die Diurese zu untersuchen, wurden Kaninchen in den allergischen Zustand versetzt, und zwar durch parenterale Injektion körperfremder Eiweiße. Die Untersuchungen fanden kürzere oder längere Zeiten nach einmaliger und mehrfach wiederholter parenteraler Injektion statt.

5. Die bloße allergische Umstimmung des Organismus führt zu einer Mobilisierung von Wasser und Elektrolyten aus den Geweben.

6. Wenn dem allergischen Zustand noch Euphyllininjektion hinzugefügt wird, ist infolge der noch größeren Mobilisierung von Wasser und Elektrolyten die Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten im Harn entsprechend wesentlich gesteigert.

7. Die Diurese im allergischen Zustande ist durch einen anhaltenden phasischen Verlauf charakterisiert.

8. Die Injektion von Euphyllin steigert die Permeabilität der Nierenzelle für Zucker, indem schon bei geringeren Blutzuckerkonzentrationen als sonst Zucker im Harn austritt. Hingegen scheint der allergische Zustand keinen merklichen Einfluß auf die Zuckerausscheidung zu haben.

9. Die mitgeteilten Tatsachen stehen im Einklang mit der Auffassung, daß unter physiologischen Bedingungen die Harnabsonderung durch den Stoffaustausch zwischen Blut und Geweben und die Empfindlichkeit der Nierenzellen für die gesetzten Veränderungen geregelt wird.

Bildung von Vitamin B durch Bac. vulgatus (Flügge) Migula aus vitaminfreien Nährlösungen.

Von

Arthur Scheunert und Martin Schieblich.

(Aus dem Veterinär-physiologischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 10. Februar 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Vor einiger Zeit berichteten wir über Versuche an Tauben, die zeigten, daß der im Darmkanal der Pflanzenfresser und auf frischen und getrockneten pflanzlichen Futtermitteln weit verbreitete, sporulierende Erdbazillus, Bac. vulgatus (*Flügge*) Migula, aus vitaminfreien Nährlösungen Vitamin B zu bilden vermag[1]). Wir hatten in einem ersten Versuch den Bazillus auf einer Nährlösung gezüchtet, die ein Dekokt von gebrannter Gerste neben *Liebigs* Fleischextrakt, Protopton (ein Hornhydrolysat), Kochsalz und H_2O enthielt. Dieser Nährboden war überdies $1\frac{1}{4}$ Stunden bei 2 Atmosphären autoklaviert worden. Wir machten uns selbst den Einwand, daß der Malzextrakt Spuren von Vitamin hätte enthalten können, und verwandten infolgedessen zu einem zweiten Versuch als Nährboden die gewöhnliche Nährbouillon (*Liebigs* Fleischextrakt, Protopton, NaCl und Aqua dest.), der $1\frac{1}{2}$ Stunden bei 2 Atmosphären autoklavisiert wurde. Auch mit auf solcher Lösung gewachsenen Vulgatuskulturen gelang es, eine Taube, die bei alleiniger Reisnahrung am 34. Tage die typischen Krämpfe gezeigt hatte, zu heilen und weitere 30 Tage gesund zu erhalten.

Gegen die Beweiskraft dieser Versuche hat *R. Bieling*[2]) geltend gemacht, daß es nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen sei, daß unsere Nährböden dennoch Spuren von Vitamin B enthalten hätten.

---

1) *Scheunert* und *Schieblich*, diese Zeitschr. **139**, 57 bis 65, 1923.
2) *R. Bieling*, Zeitschr. f. Hyg. **104**, 347 bis 357, 1925.

Bieling spricht allerdings von malzhaltigen Nährböden, mit denen wir gearbeitet hätten, was nur für den ersten unserer beiden Versuche zutreffend ist. Sein Einwand würde also eigentlich wohl nur diesen ersten Versuch treffen, gegen den wir den gleichen Einwand selbst erhoben haben. *Bieling* scheint aber den Einwand auch auf unseren zweiten Versuch zu beziehen. Es müßte dann angenommen werden, daß der verwandte *Liebigs* Fleischextrakt etwas Vitamin B enthalten hätte. Demgegenüber ist darauf hinzuweisen, daß *Chick* und *Hume*[1]) bei ihren Versuchen an Tauben *kein* Vitamin B im Fleischextrakt nachweisen konnten. Überhaupt ist der Vitamin-B-Gehalt des Fleisches *höchst zweifelhaft* [l. c.[1])]. Wir selbst haben mit dem Rattenversuch im Pferdefleisch kein Vitamin B finden können[2]). Wir betonen also, daß wir *für den zweiten Versuch den Einwand Bielings nicht anzuerkennen vermögen*. Da nun aber irgend einmal Spuren von Vitamin B im Rindfleisch gefunden worden sind, außerdem Vitamin B in gewissen drüsigen Organen, die aber zur Fleischextraktherstellung nicht Verwendung finden sollen, zugegen ist, so kann man wenigstens theoretisch den Einwand machen, daß doch in unserem Fleischextrakt Vitamin B in Spuren enthalten gewesen sei. Es ist sicher gut, die Anforderungen an die Versuchsmethodik grundsätzlich so scharf als möglich zu stellen, und ganz besonders ist dies im vorliegenden Falle wichtig, in dem eine so entscheidende Frage wie die Neubildung von Vitamin durch Bakterien geklärt werden soll. Man muß dann aber verlangen, daß die Bestandteile des Nährbodens entweder synthetischer Art oder doch so stark gereinigte Naturprodukte sind, daß ihre Vitaminfreiheit unbedingt garantiert werden kann. Wenn wir diesen Maßstab an die Versuche von *Bieling* legen, kann aber auch ihm die sichere Vitaminfreiheit seines Nährbodens nicht zugebilligt werden. Er verwandte Ammoniumlactat, zwar chemisch rein, aber ohne nähere Angabe über die Art der Reinigung. Dem Chemiker ist bekannt, daß solche käufliche Produkte keineswegs immer befriedigen. Da nun die Milchsäure ein Naturprodukt ist, das aus Milchzucker gewonnen wird, kann die Vitaminfreiheit eines milchsauren Salzes nicht ohne weiteres vorausgesetzt werden, um so weniger, als die Irrungen und Wirrungen, die die Lactose in der „künstlichen, proteinfreien Milch" bei der Entwicklung der Vitaminforschung verursacht hat, noch in frischer Erinnerung sind.

Bielings Versuche, in Kulturen von Bact. coli, Bact. pyocyaneum und Pferdemistbakterien, die auf seiner vitamin-B-freien Nährlösung gewachsen waren, Vitamin B nachzuweisen, sind nun aber durchaus negativ verlaufen. Seinen Befunden gegenüber steht das Ergebnis einer Arbeit von *Kuroya* und *Hosoya*[3]), die mit Bact. coli, das auf synthetischen Nährböden gewachsen war, gearbeitet haben und einwandfrei sowohl an Ratten als auch an Tauben Vitamin-B-Bildung nachweisen konnten. Man wird auch gegen ihren Nährboden theoretisch den Einwand erheben können, daß er Naturprodukte enthält, denen Vitaminspuren angehaftet haben könnten, trotzdem sie alle analysenreine Produkte von *E. Merck*, Darmstadt, waren. Der Nährboden enthielt nämlich unter anderem Ammoniumlactat, Asparagin, Glucose und Citronensäure, die allesamt aus Naturprodukten

---

[1]) *Chick* und *Hume*, Zit. nach Med. Res. Counc. (Report on Vitamins), S. 40. London 1924.

[2]) *Scheunert* und *Hermersdörfer*, diese Zeitschr. **156**, 58 bis 62, 1925.

[3]) *M. Kuroya* und *S. Hosoya*, Scientific reports from the government institute for infectious diseases **2**, 287 bis 304. Tokyo 1923.

gewonnen werden. Um nicht mißverstanden zu werden, wiederholen wir, daß es sich hier lediglich um theoretische Einwände handelt, deren Berechtigung weder einwandfrei bewiesen, noch widerlegt werden kann, solange wir nicht feine chemische Methoden haben, die einen Nachweis von Vitaminspuren gestatten. Wenn wir nun die Frage aufwerfen, wie sich der Widerspruch zwischen den Ergebnissen von *Kuroya* und *Hosoya* einerseits und *Bieling* andererseits erklären ließe, so ist dazu folgendes zu bemerken. *Bieling* arbeitete mit Kulturen, die ein Alter von 4 Wochen besaßen, also sehr alt waren. Wir wissen nicht, was in dieser Zeit alles an Vorgängen abgelaufen sein mag. Weiter aber dürfte *Bielings* Nährlösung ihrer ganzen Zusammensetzung nach ($NaCl$, chemisch rein, 5 g, Na_2HPO_4 1,65 g, NaH_2PO_4 0,35 g, Ammoniumlactat, chemisch rein, 6 g auf 1000 Aqua dest.) eine nahe dem alkalischen Bereich liegende Reaktion besessen haben. Das ist auch tatsächlich der Fall. Wir haben die Lösung hergestellt und fanden vor dem Sterilisieren $p_H = 6,7$, nach dem Sterilisieren $p_H = 6,8$. Mit Bact. coli beimpft, war das p_H nach 4 Tagen mit 7,2 ins alkalische Bereich eingetreten. Die Reaktion des Nährbodens von *Kuroya* und *Hosoya* hingegen dürfte eine im sauren Bereich gelegene Reaktion besessen haben. Wir stellten dementsprechend in einer solchen Lösung $p_H = 4,4$ vor und 4,6 nach dem Sterilisieren fest. Es haben vielleicht gerade die Reaktionsverhältnisse der beiderseits verwandten Nährböden eine Rolle gespielt. Wir haben nämlich an anderer Stelle gezeigt, daß für den Bac. vulgatus die H-Ionenkonzentration der Nährlösung von großer Wichtigkeit für die Bildung von Vitamin B ist[1]).

Im übrigen haben in der Zwischenzeit zur Frage der Vitaminbildung durch Mikroorganismen noch einige andere Autoren Versuche beigebracht. So konnte *Damon*[2]) im Rattenversuch die Bildung von Vitamin B durch säurefeste Bakterien, und zwar Bac. thimothy, Bac. smegmatis und Bac. moelleri nachweisen. *Hoet, Leclef* und *Delrue*[3]) fanden Bildung von Vitamin B durch Monilia candida, während sie mit Torula rosea und Mycoderma cerevisiae negative Ergebnisse erhielten. Wir erwähnen diese Angaben nur der Vollständigkeit halber, um zu zeigen, daß im Gegensatz zu *Bieling* verschiedene Autoren zu positiven Resultaten kamen. Es bleibt dabei stets auch wohl zu beachten, daß die einzelnen morphologisch und bezüglich ihrer Vegetationsverhältnisse ganz verschiedenen Arten keine übereinstimmenden synthetischen Fähigkeiten zu besitzen brauchen, ebensowenig, wie sie in ihren sonstigen Stoffwechselvorgängen ein gleichmäßiges Verhalten zeigen.

Auf Grund des im vorstehenden Dargelegten kam es uns darauf an, die Bildung von Vitamin B durch Bac. vulgatus einwandfrei sicherzustellen. Es mußte also eine Nährlösung gefunden werden, die nur solche Substanzen enthielt, von denen einwandfrei Vitamin-B-Freiheit nachgewiesen werden konnte. Weiter legten wir besonderen Wert darauf, die N-Quelle möglichst einfach zu gestalten. Durch diese

---

[1]) *Scheunert* und *Schieblich*, Liebigs Ann. **453**, 249—258, 1927.

[2]) *S. R. Damon*, Journ. of pathol. and bacteriol. **27**, 163 bis 169, 1924.

[3]) *Hoet, Leclef* und *Delrue*, Arch. internat. de physiol. **23**, 284 bis 298, 1924.



Wünsche wurde die Anzahl der für die Nährlösung in Frage kommenden Bestandteile sehr beschränkt, und es wurde dadurch wider Erwarten recht schwierig, eine allen Anforderungen entsprechende Nährlösung zu finden, die ein rasches Wachstum mit guter Ausbeute gestattete. Unter den 61 Nährlösungen, die wir im Laufe der Zeit zusammengestellt und geprüft haben, gewährte zunächst eine, die sich in verschiedener Richtung der bekannten Maaßenlösung anpaßte, befriedigendes Wachstum. Auch auf ihr konnte eine Vulgatusmasse gezüchtet werden, die Vitamin B enthielt, wie wir an anderer Stelle berichteten (l. c.). Hierbei machten wir die schon erwähnte Beobachtung, daß für das Wachstum eines vitamin-B-reichen Bac. vulgatus die H-Ionenkonzentration von recht großer Bedeutung ist, und zwar war es nötig, das p_H vor der Beimpfung unter 7,6 zu halten. Neuerdings gelang es nun, eine Nährlösung zu finden, die allen Anforderungen entsprach. Diese bestand aus 7 g Äpfelsäure, 10 g kristallisiertem $NaNH_4HPO_4$, 0,4 g $MgSO_4$, 0,01 g $CaCl_2$, 2 g K_2HPO_4, 20 g Glucose und 1000 g Aqua dest. Zur Herstellung der Lösung wurde die Äpfelsäure mit Ätzkali fast neutralisiert, dann die anderen Bestandteile zugegeben, und das p_H mit der Indikatorenmethode von *L. Michaelis* bestimmt und dann soviel verdünnte KOH zugegeben, bis der Neutralitätspunkt, $p_H = 7,1$, erreicht war. Diese Lösung wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 10 Minuten im strömenden Dampf sterilisiert und zur Beimpfung verwandt. Über die Bestandteile ist noch folgendes zu bemerken:

Die *Mineralsalze* waren selbstverständlich vitaminfrei.

Die *Äpfelsäure* war *synthetische* Äpfelsäure der Firma *E. Merck* und für uns besonders hergestellt worden. Sie war also sicher vitaminfrei.

Die *Glucose* stellten wir uns selbst her, und zwar wurde als Ausgangsmaterial die Maispuderstärke der Deutschen Maizenawerke verwandt, die uns von den Deutschen Maizenawerken für unsere Vitaminuntersuchungen in dankenswerter Weise unentgeltlich zur Verfügung gestellt wurde.

Diese Stärke ist ihrer Herkunft und Herstellung nach schon an sich vitamin-B-frei. Das Maisendosperm ist, wie *Croll* und *Mendel*[1]) zeigten, praktisch vitamin-B-frei. Zur Gewinnung dieser Stärke werden nach dem Verfahren der Deutschen Maizenawerke die gequollenen Maiskörner von Keimen und Hülsen befreit. Durch Sieben wird die Endospermstärke weitgehend abgetrennt und dann, mit gewaltigen Wassermengen vermischt, über große Tische geleitet, auf die sich die spezifisch schwerere Stärke niedersenkt, während die löslichen und leichteren Bestandteile abfließen. Die abgesetzte Stärke wird erneut mit großen Wassermengen vermischt, also nochmals gründlich ausgewaschen und auf Filterpressen zur Trocknung, die dann bei hoher Temperatur erfolgt, vorbereitet. Diese Stärke ist also

[1]) *Croll* und *Mendel*, Amer. Journ. of Physiol. **74**, 674 bis 694, 1925.



von allen löslichen Teilen, und dazu gehört das Vitamin B, sowie von allen Teilen, die nicht Endosperm sind, befreit.

Da wir diese Stärke als *regelmäßigen* Bestandteil der vitamin-B-freien Kost bei unseren Vitaminversuchen verwenden, sind wir in der Lage, durch *Hunderte von Versuchen ihre Vitamin-B-Freiheit zu beweisen.* Diese Stärke wurde nochmals mehrfach mit kaltem Wasser und kochendem 96proz. Alkohol extrahiert und dann zur Glucosedarstellung verwandt, die vom Assistenten, Chemiker Dr. *Reschke*, besonders sorgfältig ausgeführt wurde.

Hierzu wurde die Stärke im Autoklaven mit der neunfachen Menge 1proz. Schwefelsäure 8 bis 10 Stunden bei einer Atmosphäre hydrolysiert, hierauf mit Bariumcarbonat neutralisiert, vom Niederschlag abgesaugt, mit Tierkohle entfärbt, eingedickt und schließlich im Vakuum so weit konzentriert, daß das Material nach Erkalten kaum knetbar war. Dieses wurde im geschlossenen Gefäß mit kochendem Methylalkohol gemischt und bis zum Auskristallisieren stehengelassen. Die körnige Masse wurde abgesaugt, mit Methylalkohol gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Aus 1 kg Stärke wurden 600 bis 700 g Glucose gewonnen.

Auf den mit dieser sicher vitamin-B-freien Glucose hergestellten Nährlösungen, die zu je 500 ccm in Fernbachkolben beimpft wurden, wuchs der Bac. vulgatus innerhalb 6 bis 7 Tagen zu dichten, leicht rosa gefärbten, kaum schleimigen Decken aus. Diese wurden sorgfältig gesammelt und bei 37° (Brutschranktemperatur) getrocknet. Man erhielt dabei eine leimartige, spröde Masse, die direkt oder vorher etwas eingeweicht als Vitaminzulage verabreicht werden konnte. An der Bakterienmasse haben sicher noch Spuren der Nährlösung gehaftet, da ein Auswaschen zur Vermeidung von Verlusten nicht in Frage kam. Das p_H der Nährlösung lag nach Abnahme der Vulgatusdecke zwischen 6,0 und 6,2, war also ins saure Bereich verschoben. Ein Einfluß der während des Trocknens anhaftenden Nährlösungsspuren auf den Vitamingehalt der Vulgatusmasse ist nicht anzunehmen. Die für die Fütterungsversuche benötigten Vulgatusmengen wurden fortlaufend gezüchtet. Wir gewannen auch hier wieder den Eindruck, daß die ganz frischen, getrockneten Kulturen besser wirkten als längere Zeit aufbewahrte. Insgesamt wurden 134 Liter Nährlösung beimpft, die eine Ausbeute von rund 240 g Vulgatustrockenmasse ergaben, so daß auf 1 Liter Nährlösung durchschnittlich 1,8 g Vulgatustrockenmasse erzielt wurde.

Die Prüfung der Vulgatusmasse auf ihren Gehalt an Vitamin B erfolgte im Rattenversuch, der im einzelnen in der von uns mehrfach beschriebenen Weise ausgeführt wurde. Die Ratten befanden sich einzeln in Glaskäfigen auf Sägespänen und wurden im Alter von 3 bis 4 Wochen und im Gewicht von 40 bis 60 g zu den Versuchen verwendet. Sie erhielten unsere vitamin-B-freie Grundnahrung, die aus 20 Proz.

Casein, 15 Proz. gehärtetem Pflanzenfett, 6,14 Proz. Salzgemisch nach *Osborne* und *Mendel* und 58,86 Proz. der erwähnten vitamin-B-freien Maisstärke bestand. Als Vitamin-A-Quelle wurden den Ratten täglich 0,5 g Butterfett zugegeben. Die Vitamin-B-Freiheit des Caseins war durch die bei uns übliche bewährte Extraktionsmethode (Auskochen mit Wasser, Alkohol und Äther) gesichert. Die Ratten wurden zweimal in der Woche gewogen, und alle 7 Tage wurde der Futterverzehr festgestellt und durchschnittlich berechnet. Insgesamt wurden 13 Ratten zu den Versuchen verwendet.

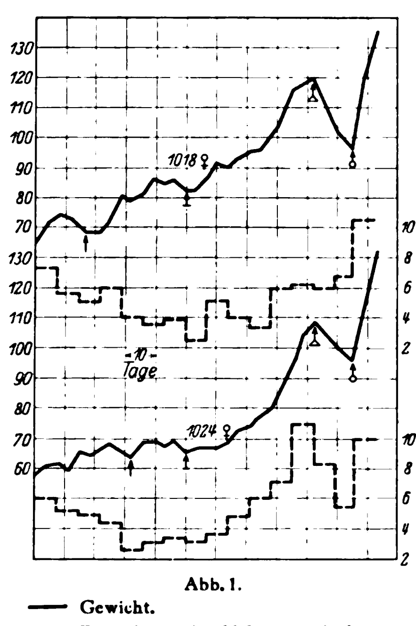


Abb. 1.

—— Gewicht.
--- Tägl. durchschn. Nahrungsaufnahme.
↑ 0,1 g Vulgatustrockenmasse.
↑ 0,4 g Vulgatustrockenmasse.
⩓ Vulgatusgabe fällt weg.
↑ 0,5 g Trockenhefe.

In einem ersten Versuche an zwei Tieren, Nr. 1018 und 1024, wurden nach Auftreten der Zeichen des Vitamin-B-Mangels (Wachstumsstockung, struppiges Aussehen, Abmagerung) zunächst 0,1 g Vulgatustrockenmasse zugelegt. Diese genügte, wie die Kurven zeigen (Abb. 1), nicht, um das Wachstum in Gang zu bringen. Deshalb wurde am 50. Tage bei beiden Tieren die Vulgatusgabe auf 0,4 g erhöht. Diese Zugabe brachte das Wachstum in Gang. Nach weiteren 42 Tagen wurde die Vulgatuszulage entzogen, worauf sofort Gewichtsrückgang

einsetzte. Um zu zeigen, daß nur der Vitamin-B-Mangel die Ursache dieses Rückgangs war, wurden am 105. Versuchstage 0,5 g Trockenhefe zugegeben, was sofortigen schnellen Gewichtsanstieg zur Folge hatte.

Nach diesen beiden als Vorversuch anzusehenden Versuchen enthielt der Bac. vulgatus in der Tat Vitamin B. Wir haben nun durch

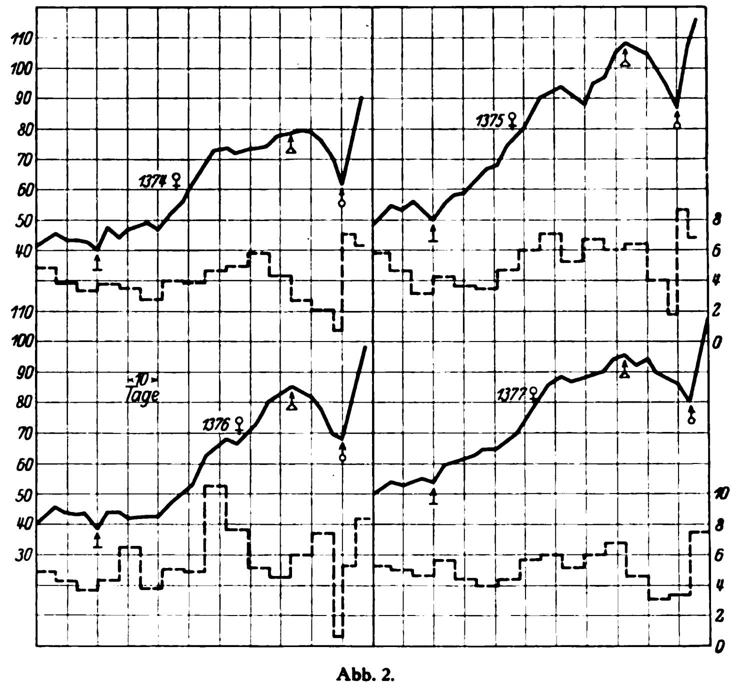


Abb. 2.

—— Gewicht.

--- Tägliche durchschnittliche Nahrungsaufnahme.

0,2 g Vulgatustrockenmasse.

Vulgatusgabe fällt weg.

0,5 g Trockenhefe.

drei weitere Versuchsreihen dieses Ergebnis erhärtet. In diesen erhielten die Versuchsratten in der ersten Reihe, Ratten 1374 bis 1377, 0,2 g Vulgatuszulage; in der zweiten Versuchsreihe, Ratten 1378 bis 1381, 0,3 g Vulgatuszulage; in der dritten Reihe, Ratten 1382 bis 1384, 0,4 g Vulgatuszulage. Die Versuche wurden genau so angelegt, wie oben geschildert. Der Vitamin-B-Mangel war durchweg am 20. Versuchstage unter dem Zeichen der Wachstumsstockung eingetreten. Bei sämtlichen Tieren erfolgte von diesem Tage an die Vulgatuszulage. Diese wurde *62 Tage* gereicht, dann entzogen, um zu zeigen, daß Gewichtsrückgang,

also Vitamin-B-Mangel einsetzte. Am 100. Tage erfolgte dann Vitamin-B-Zufuhr durch Hefezugabe. Die Ergebnisse der Versuche sind wieder kurvenmäßig dargestellt (Abb. 2, 3 und 4). Sie sind vollständig eindeutig. Mit der Vulgatuszulage setzte sofort das Wachstum ein, und die Nahrungsaufnahme wurde verbessert. Wie die Wachstumskurven

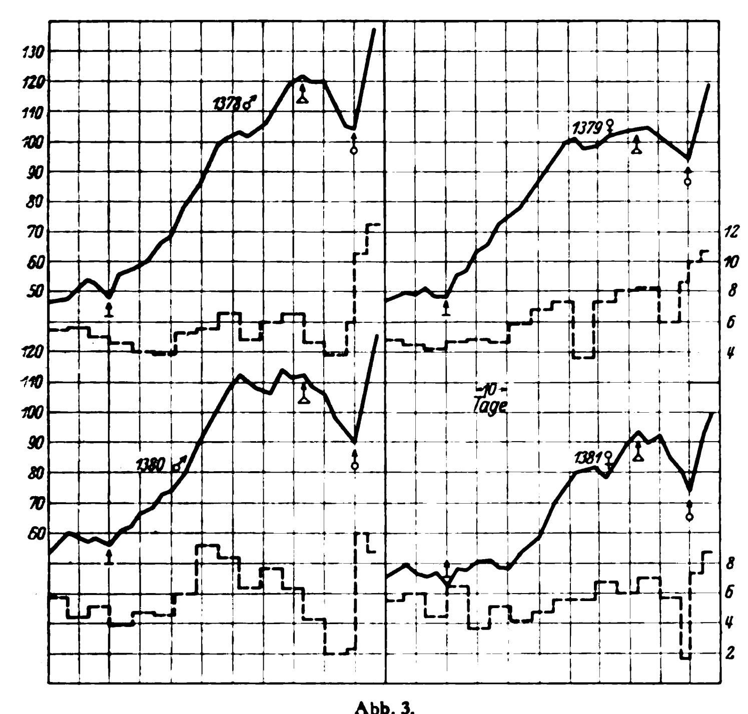


Abb. 3.

——— Gewicht.

– – – Tägliche durchschnittliche Nahrungsaufnahme.

↑ 0,3 g Vulgatustrockenmasse.

Vulgatusgabe fällt weg.

0,5 g Trockenhefe.

deutlich zeigen, war die Zulage von 0,4 g Vulgatustrockenmasse wirksamer als die Zulage von 0,2 g. Zum Teil traten im Verlauf der Vulgatusperiode Gewichtsstillstände oder vorübergehende Gewichtsrückgänge ein. Bei geringen Vitaminzugaben sieht man solche Schwankungen öfter. Es ist möglich, daß sie auf eine etwas geringere Wirkung der betreffenden Vulgatusgabe zurückzuführen sind, wahrscheinlicher aber ist, da sie bei allen drei Zulagen ungefähr zu gleicher Zeit eintraten, daß äußere Umstände, Witterungseinflüsse und dergleichen, auf die die Ratten sehr leicht reagieren, verantwortlich zu machen sind.

Diese Schwankungen ändern aber nichts an der Tatsache, daß *bei allen Vulgatusgaben und bei allen Tieren das Wachstum über die ganze Dauer der Zulage, also 62 Tage, unterhalten worden ist*, und weiter, daß *mit Wegfall* der Zulage durchweg ein *starker fortschreitender Gewichtsrückgang* einsetzte, der sicher auf Vitamin-B-Mangel beruhte, da nach *Hefezugabe sofort wieder rasche Gewichtszunahme* einsetzte. Alle Versuche haben somit übereinstimmend zu dem Ergebnis geführt, daß die Bac. vulgatus-Massen den Ratten als Vitamin-B-Quelle gedient haben.

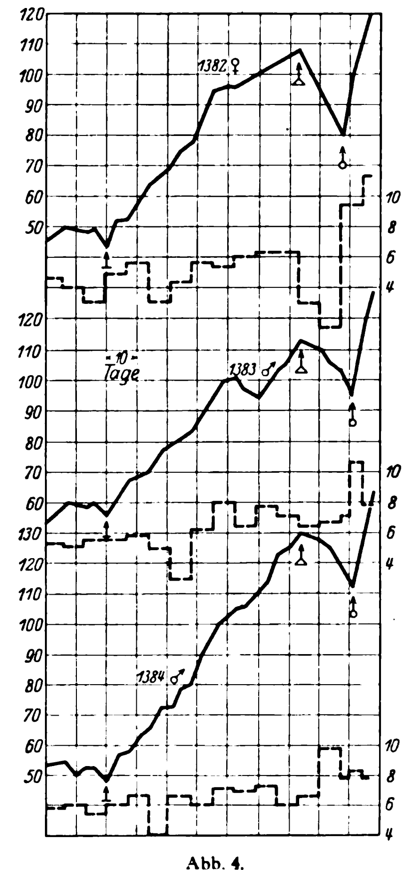


Abb. 4.

—— Gewicht.
– – – Tgl. durchschn. Nahrungsaufnahme.
0,4 g Vulgatustrockenmasse.
Vulgatusgabe fällt weg.
0,5 g Trockenhefe.

Zusammenfassung.

Auf einer Nährlösung, die außer Mineralsalzen und synthetisch hergestellter Äpfelsäure aus im Tierversuch als vitamin-B-frei befundener Maisstärke hergestellte Glucose enthielt, wurde Bac. vulgatus (*Flügge*) Migula gezüchtet. Im Rattenversuch wurde nachgewiesen, daß die getrockneten Bac. vulgatus-Massen in Mengen von 0,2 bis 0,4 g pro Tag genügten, wachsenden Ratten hinreichend Vitamin B zuzuführen, um Wachstum während der 62 tägigen Dauer dieser Versuchsperiode zu unterhalten. *Somit vermag Bac. vulgatus Vitamin B aus sicher vitamin-B-freien Nährlösungen zu bilden.*

Zur Frage der allgemeinen Verwendbarkeit der Kohlenstoffbestimmung in organischen Substanzen durch Oxydation auf nassem Wege.

Von

B. Lustig.

(Aus dem pathologisch-chemischen Laboratorium der Rudolfsstiftung, Wien.)

(Eingegangen am 10. Februar 1927.)

Die Bestimmung des Kohlenstoffs in organischen Substanzen durch Oxydation auf nassem Wege ist seit *Messinger*[1]) vielfach versucht worden, doch ist keine der bis jetzt gefundenen Methoden von allgemeiner Anwendbarkeit. Die Fehler sind die Kompliziertheit der Apparatur, die lange Dauer der Verbrennung und daß manche Methoden nur für bestimmte Gruppen von organischen Substanzen ausgearbeitet wurden.

So dauert z. B. nach *Mancini*[2]) die Verbrennung von phosphorwolframsäurehaltigen, physiologischen Flüssigkeiten mindestens 7 Stunden. Die Apparatur besteht bei *Messinger*[1]), *Küster-Stahlberg*[3]), *Kjeldahl*[4]) und anderen[5]) aus dem Verbrennungskolben, in dem die Substanz mit konzentrierter Schwefelsäure und Chromsäure verbrannt wird, daran angeschlossen ein mit Kupfer- oder Quecksilberoxyd gefülltes, auf 300 bis 500° C erhitztes Verbrennungsrohr, um entweichendes Kohlenoxyd und etwaige Kohlenwasserstoffe zu Kohlensäure zu verbrennen; das Verbrennungsrohr ist andererseits mit Absorptionsapparaten verbunden, deren es z. B. bei *Mancini*[2]) fünf gibt. Die Verbrennung wird im Sauerstoff- oder Luftstrom durchgeführt. Etwas einfacher ist die Apparatur bei *Berl* und *Ines*[6]). Sie verwenden zur Verbrennung Phosphorsäure und Schwefelsäure mit Quecksilber als Katalysator, doch ist die Methode hauptsächlich für aliphatische Hydroxylverbindungen bestimmt

Den Nachteilen dieser Methoden stehen viele Vorteile gegenüber. Bei vielen organischen Substanzen ist der Kohlenstoff nur auf dem Wege der

---

1) Ber. **21**, 2910, 1888; **23**, 2756, 1890.
2) Diese Zeitschr. **21**, 149, 1912.
3) Liebigs Ann. **278**, 215, 1894.
4) Zeitschr. f. analyt. Chem. **31**, 216, 1892.
5) *Simonis* und *This*, Chem.-Ztg. **38**, 1914; **44**, 1920. — *Robertson*. Soc. **109**, 215, 1916 u. a.
6) Ber. **42**, 1305, 1909.

nassen Verbrennung bestimmbar, so z. B. nach *Albert*[1]) das N . N'-Iminoindigo und sein Acetylderivat, nach *Struss*[2]) das Chlorhydrat der (4)-Aminocumarilsäure und anderes, *Steinkopf*[3]) fand, daß der Kohlenstoffgehalt organischer Arsenverbindungen nur durch Oxydation auf nassem Wege genau bestimmbar ist. Dasselbe gilt nach anderen Autoren[4]) für Thallium, Schwefel, phosphorhaltige und für viele explosive Stoffe. Von besonderem Interesse ist die Verbrennung für die physiologische Chemie, da sie ohne komplizierte Reinigungsprozesse den Kohlenstoffgehalt auch verdünnter physiologischer Flüssigkeiten, wie Blut, Harn und anderes, zu bestimmen ermöglicht. Besonders ist die Methode der nassen Verbrennung für alle die Fälle zu empfehlen, bei denen nur der Kohlenstoff gebraucht wird, weil man bei relativ geringer Übung und geringem Gasverbrauch auch Stickstoff enthaltende Körper ohne besondere Vorrichtungen verbrennen kann. Daß ein Wegfallen des Verbrennungsrohres bei manchen Stoffen möglich ist, zeigt *W. Stepp*[5]) bei der Verbrennung der Phosphor-Wolframsäurefiltrate des Blutes. Er bekam durch Einschaltung eines mit Kupferoxyd gefüllten und erhitzten Verbrennungsrohres gleiche Resultate wie ohne Verbrennungsrohr. Die Verbrennung wird mit Chromsäure und Schwefelsäure durchgeführt, doch mit Kaliumpermanganat beendet. Zwischen den Kolben und den Absorptionsapparaten wird von ihm ein Kühler eingeschaltet, um zu vermeiden, daß etwaige Säuredämpfe in die Absorptionsapparate gelangen. Eine weitere Vereinfachung führten *E. Freund* und *G. Botstiber*[6]) durch. Sie verwendeten zur Verbrennung eine 1proz. schwefelsaure Kaliumpermanganatlösung, das entstehende Kohlendioxyd wird in n/4 Kalilauge aufgefangen, mit Bariumchlorid gefällt und der Überschuß der Kalilauge mit Phenolphthalein zurücktitriert. Sie führten die Untersuchung der Verbrennbarkeit von Weinsäure, Harnsäure, Asparaginsäure, Benzoesäure und Casein durch. Am längsten dauerte die Verbrennung bei Casein, das 5 Stunden erforderte, doch steht dem als Vorteil gegenüber, daß die Verbrennung fast keinerlei Aufsicht bedarf. In einer anderen Arbeit untersuchte *G. Botstiber*[7]) auch die Verbrennbarkeit von Milchsäure und Hippursäure. Andere Stoffe, besonders heterozyklische und Alkaloide, wurden nicht untersucht, da die Methode für die medizinischen Zwecke der Harn- und Blutuntersuchung bestimmt war.

Es handelte sich bei uns nun darum, die Methode von *E. Freund* und *G. Botstiber*[8]) für die allgemeine Kohlenstoffbestimmung nutzbar zu machen, weiter, ob durch Anwendung von Katalysatoren, durch Mitverwendung von anderen Oxydantien neben Permanganat und durch Steigerung der Konzentration des Kaliumpermanganats und der Schwefelsäure eine Verkürzung der Verbrennungszeit zu erreichen wäre, und schließlich die etwaige Ausnutzung auf die analytische Verwendbarkeit für die Konstitutionsermittlung.

---

[1]) Ber. **52**, 534, 1918.
[2]) Dissert. Rostock 1907.
[3]) Ber. **54**, 848, 1921.
[4]) *H. Meyer*, Analyse und Konstitutionserm. org. Substanzen. I. Springer 1925.
[5]) Diese Zeitschr. **87**, 143, 1918.
[6]) Ebendaselbst **136**, 145, 1923.
[7]) Ebendaselbst **174**, 69, 1926.
[8]) Ebendaselbst **136**, 145, 1923

Um die Grenzen der Brauchbarkeit der Methode zu finden, wurden nun verschiedene Gruppen von organischen Substanzen, besonders aromatische, heterozyklische Azoverbindungen und Alkaloide, auf ihre Verbrennbarkeit untersucht, auch wurde das Verhalten des Stickstoffs, Phosphors, Schwefels und Halogene der organischen Substanzen bei der Verbrennung mit Kaliumpermanganat einer Untersuchung unterzogen (Tabelle I).

Apparatur und Methodik.

Die verwendete Apparatur bestand aus einem Jenaer Literkolben mit eingeschliffenem Tropftrichter und senkrechtem (Energie- oder fünf bis sechs Birnen-) Kühler. Das Rohr des Tropftrichters reichte bis zum Boden des Kolbens und endete in einer Kapillare. Durch einen in den Stöpselschliff des Tropftrichters passenden Ansatz war die Apparatur, um das Durchleiten von CO_2-freier Luft zu ermöglichen, mit einem Natronkalkturm und einer mit 50 proz. Kalilauge gefüllten Waschflasche verbunden. Vom Kühler führte ein zweimal gebogenes Glasrohr zu einem mit n/4 Kalilauge gefüllten Peligot, dessen andere Seite mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden war. Zur Kontrolle der genügenden Absorption war noch ein mit n/10 BaOH gefülltes Peligot angeschlossen, daß nicht mehr als eine schwache Trübung zeigen durfte. Der Gang der Verbrennung war folgender: In den Kolben wurden 100 bis 200 ccm Wasser und 40 bis 50 ccm einer schwefelsauren Kaliumpermanganatlösung eingefüllt. Die verwendete Kaliumpermanganatlösung wurde schon vorher, um sie von CO_2 zu befreien, 3 bis 5 Stunden am Wasserbad erhitzt, sie enthielt 4 Proz. Kaliumpermanganat, 2 bis 3 Proz. Schwefelsäure, 10 bis 15 Proz. Natrium- oder Kaliumsulfat. Die Schwefelsäure wurde in 50proz. Lösung zugegeben, die vorher nach Angabe von *W. Stepp*[1]) durch Erhitzen mit einigen $KMnO_4$-Kristallen gereinigt wurde. Durch die Zugabe von Natrium- oder Kaliumsulfat wird die Braunsteinbildung bei der Verbrennung erheblich vermindert, was mit einer besseren Ausnutzung des $KMnO_4$ infolge der geringeren Zersetzung verbunden ist. Nach der Zugabe des $KMnO_4$ wird der offene Kolben (der Kühler wird 3 bis 4 cm höher gestellt) einige Minuten gekocht, um die Reagenzien CO_2 frei zu machen, dann wird der Kolben geschlossen und bei abgedrehter Flamme durch Verbinden mit dem Tropftrichteransatz in CO_2-freiem Luftstrom ausgekühlt. Das Einführen der Substanzen geschieht bei wasserlöslichen durch den Tropftrichter, um möglichst wenig Außenluft in den Apparat gelangen zu lassen, bei wasserunlöslichen Substanzen wird die Substanz in eine 5 bis 8 mm breite, 20 bis 30 mm lange, dünnwandige Eprouvette ein-

[1]) Diese Zeitschr. 87, 143, 1918.

gewogen, der Kolben vorsichtig geöffnet und das Röhrchen mit einer Pinzette vorsichtig hineingegeben. Dann wird der Kühler vorsichtig wieder aufgesetzt und bei abgesperrter Luftzufuhr und offener Wasserstrahlpumpe eine angemessene Zeit erhitzt. Nach Abdrehen der Flamme und nach Absperrung der Wasserstrahlpumpe wird der Kolben durch Öffnen des Tropftrichterhahns im CO_2-freien Luftstrom ausgekühlt. Der Peligot wird gegen einen anderen mit titrierter Kalilauge beschickten ausgetauscht, die Apparatur dann nochmals 15 bis 30 Minuten erhitzt, um die Vollständigkeit der Verbrennung zu kontrollieren. Die Einwagen von Flüssigkeiten (wie Chinolin und anderes) wurden in Ampullen vorgenommen. Die Titration wurde in der Weise ausgeführt, daß eine ab gemessene Menge einer 10proz. Bariumchloridlösung und 50 ccm heißen, destillierten Wassers zugegeben wurden, um die vorhandene Kohlensäure als körniges $BaCO_3$ zu fällen, der Überschuß der Kalilauge wurde nach *Winkler*[1]) mit Phenolphthalein und Salzsäure titriert. Die Salzsäure wird langsam und unter beständigem Rühren zugegeben. Die vorgelegte Kalilauge wurde vor jeder Titration auf ihren CO_2-Gehalt untersucht. Die Substanzmenge, die zur Verbrennung gelangte, schwankte, je nach dem Kohlenstoffgehalt der betreffenden Substanz, zwischen 40 bis 120 mg. Um ein etwaiges Entstehen von Kohlenoxyd bei unvollständigen Verbrennungen zu kontrollieren, wurde zwischen dem Peligot und der Wasserstrahlpumpe eine kleine mit $PdCl_2$ gefüllte U-Röhre eingeschaltet, doch konnte bei keiner Verbrennung ein Entweichen von CO nachgewiesen werden.

Es wurden außer den in der Tabelle I angegebenen Substanzen: Casein (Verbrennungsdauer 5 Stunden), Trockenserum (5 Stunden), Amidoazotoluolbase (3 Stunden), Pyrrol (4 Stunden), Tyrosin ($2^1/_2$ Stunden) und Glykokoll (3 Stunden) verbrannt. Die Kohlenstoffwerte der einzelnen Substanzen wurden aus der Formel berechnet, mit Ausnahme des Caseins, Globulins und Trockenserums, deren Kohlenstoffwerte nach *Pregl* bestimmt wurden. Für die Verbrennungen wurden stets Substanzen von *Merck* und *Kahlbaum* verwendet. Das verwendete Globulin wurde aus Serum durch $^1/_3$-Sättigung mit Ammonsulfat gefällt, 14 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert und im Vakuum bei 40° C zur Trockne eingedampft.

Die in der Tabelle gefundenen Resultate ergeben, daß bei den meisten Stoffen die Dauer der Verbrennung 2 bis 5 Stunden beträgt. Nicht vollständig verbrannt werden nur die Substanzen, die entweder wie Campher schon bei gewöhnlicher Temperatur sehr flüchtig sind oder mit dem Wasserdampf flüchtig, im Wasser unlöslich sind und im Kühler hängen bleiben (wie z. B. Stearinsäure oder Naphthalin). Die

[1]) *Treadwell*, Quantit. Analyse 1921, S. 184, (Deuticke).

Tabelle I.

Art und Menge der Substanz	Verbrennungsdauer	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert in Proz. des berechneten
Salicylsäure				
0,1489	3h	60,25	60,35	100,1
0,0756	3	30,77	30,45	99,2
0,0895	2	36,34	34,16	94,0
Nitranilin				
0,0852	1 30′	29,61	26,80	90,5
0,0530	2	18,42	18,38	99,8
0,1241	2	42,13	41,95	99,1
Dimethylamido-benzaldehyd				
0,0583	2	28,93	28,65	99,2
0,1968	2	53,00	53,10	100,2
0,0456	1	22,32	13,95	62,0
α-Naphthol				
0,0485	2	27,38	27,40	100,0
0,0991	1 15	55,94	45,75	82,0
0,0856	2	47,32	47,50	100,4
Campher				
0,0895	1	51,36	11,50	24,4*)
0,0382	2	19,95	9,20	46,0
0,0483	3	25,20	10,40	41,0
Thymol				
0,0755	2 30	40,24	30,25	75,0**)
0,0682	2	36,35	25,00	68,9
0,0540	3	28,80	18,95	65,8
Hydrochinon				
0,0401	1	17,48	16,25	92,9
0,1004	2	43,94	44,00	100,0
0,0820	1 30	35,75	35,55	99,3
0,0524	1 30	27,25	27,20	100,0
Cumarin				
0,0586	2	28,89	28,55	98,7
0,0455	2 30	22,43	22,30	99,6
0,0782	2 30	38,55	38,25	99,2
Naphthalin				
0,0836	1	52,22	17,30	33,0***)
0,0542	2	33,85	15,95	47,0
0,0482	2	29,00	15,20	52,4
Diphenylcarbazid				
0,0627	1 30	26,96	26,55	98,4
0,0820	2	35,26	35,15	99,8
0,0458	2	19,70	19,50	99,0

*) Infolge der großen Flüchtigkeit der Substanz konnte trotz des langsamen Erwärmens mit kleiner Flamme immer ein Teil im Peligot gefunden werden.

**) Auch hier gelang die Verbrennung infolge der großen Flüchtigkeit der Substanz nicht, doch waren die erhaltenen Werte (in Proz.) infolge der geringeren Flüchtigkeit gegenüber Campher größer wie bei diesem.

***) Das Naphthalin befand sich zum großen Teil an der Kühlerwand klebend, infolge der Flüchtigkeit des Naphthalins mit dem Wasserdampf. Eine ähnliche Erscheinung zeigte die ebenfalls untersuchte Stearinsäure.

Tabelle I (Fortsetzung).

Art und Menge der Substanz	Verbrennungsdauer	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert in Proz. des berechneten
o-Oxychinolin				
0,0878	1h45′	43,57	43,15	99,2
0,0562	1 30	27,78	26,98	96,7
0,0628	2	30,15	30,35	100,6
Pyridin				
0,1642	4	84,23	83,97	99,7
0,0585	4	30,01	29,59	89,6
0,1058	4 30	54,27	54,45	100,3
Chinolin				
0,0450	3 30	25,10	25,00	99,6
0,0586	3	27,14	26,28	96,8
0,2000	3 30	111,54	110,92	99,4
Dimethylamidoantipyrin				
0,0716	2	32,22	28,25	87,7
0,0565	3	25,36	25,15	99,2
0,1012	3	45,56	45,20	99,2
Indoxylsäure				
0,0666	3	27,04	25,33	94,0
0,0425	4	17,26	17,45	101,1 *)
0,0848	4	34,43	34,25	99,5
Harnsäure				
0,1413	1 30	33,06	33,10	100,1
0,1256	1 30	29,40	29,25	99,8
Strychnin				
0,0948	1	47,68	44,75	94,0
0,0792	2	39,83	39,65	99,2
0,0357	2	25,46	25,30	99,3
Chininbisulfat				
0,0642	2 30	17,75	17,65	99,8
0,0742	2 30	11,90	12,25	102,7 *)
0,0928	2 30	25,80	25,95	100,5
0,1212	2	33,69	32,90	97,6
Coffein				
0,0528	2	17,43	16,90	97,0
0,1278	2 30	42,17	42,20	99,9
0,1255	2	41,51	41,60	100,2
Morphin				
0,0414	1 30	18,57	18,58	100,0
0,1052	1	47,18	46,20	98,0
0,0633	1 30	28,39	28,20	99,3
Globulin				
0,0862	4 30	30,36	30,50	100,4
0,1206	4	42,33	40,90	96,6
0,0956	4 30	33,56	33,15	99,0
0,0585	5	20,53	20,50	99,9

*) Zu kleine Einwage.

mangelnde Verbrennung ist nur auf die angegebenen Ursachen zurückzuführen und nicht auf die mangelnde Verbrennbarkeit. Der in der organischen Substanz enthaltene Stickstoff wird zum großen Teile in Nitrate umgewandelt. Es konnten in dem Verbrennungsrückstand von stickstoffhaltigen Substanzen sowohl mit Diphenylamin wie auch mit der Eisenvitriolprobe Nitrate nachgewiesen werden, die vor der Verbrennung nicht vorhanden waren, im Peligot konnte kein Nitro- oder Amino-Stickstoff nachgewiesen werden. Es wurde auch Casein in größerer Menge (0,2 bis 0,6 g) mit Kaliumpermanganat 5 Stunden verbrannt, die Lösung mit Wasserstoffsuperoxyd versetzt, dann wurde Ammonnitrat und Salpetersäure zugegeben und mit Ammonmolybdat gefällt. Die Fällungen wurden nach *Neumann* titriert, und sie ergaben die entsprechenden Phosphorwerte. Die Einführung einer Hydroxylgruppe bewirkt eine kürzere Verbrennungszeit, wie z. B. bei Oxychinolin im Gegensatz zu Chinolin. Umgekehrt bewirkt die Einführung von Methylgruppen eine längere Verbrennungszeit, wie z. B. bei Thebain (Tabelle II) im Gegensatz zu Morphin (Tabelle I).

Die Verbrennung von organischen, chlorhaltigen Substanzen ergab, daß eine geringe Menge Chlor in den Peligot gelangte, so wurden z. B. bei der Verbrennung von Chloranil Chlorwasserstoff und unterchlorige Säure mit Silbernitrat in salpetersaurer Lösung und mit Indigo nachgewiesen. Um dieses zu vermeiden, wurden vor der Verbrennung chlorhaltiger Substanzen 1 bis 3 ccm einer 2proz. Silbernitratlösung der Verbrennungsflüssigkeit zugefügt. Es konnten in diesem Falle bei keiner der untersuchten Substanzen im Peligot Cl nachgewiesen

Tabelle II.

Chlorhaltige. organische Substanzen, verbrannt mit Permanganat und $AgNO_3$.

Art und Menge der Substanz	Verbrennungsdauer	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert in Proz. des berechneten
Chloranil				
0,0566	2h30′	14,18	14,30	100,8
0,1156	2	28,96	28,20	97,3
0,1254	2 30	31,41	31,55	99,5
0,1425	2 30	35,70	35,60	99,7
Anilinum hydrochloric.				
0,0920	2	34,03	32,80	96,5
0,0881	2 30	32,63	32,70	100,2
0,1013	2 30	37,50	37,70	100,5
0,0858	2 30	31,80	31,60	99,3
Thebain. hydrochloric.				
0,0856	2	36,40	32,20	88,5
0,1226	3	53,57	53,70	100,2
0,0625	3	26,30	26,15	99,6
0,0892	3	41,98	41,70	99,5

werden. Die gefundenen Kohlenstoffwerte stimmen mit den berechneten überein (Tabelle II). Es wird Sache unserer weiteren Untersuchung sein, nach dieser Methode den Weg zu einer quantitativen Bestimmung der Halogene zu finden.

Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd.

Nachdem die vorhergehenden Versuche die Verwendbarkeit der Methodik bei verschiedenen organischen Substanzen erwiesen haben, versuchten wir, ob durch Vorbehandlung der Substanz mit anderen Oxydationsmitteln, eine Verkürzung der Verbrennungszeit zu erreichen wäre. Die etwaige Verwendung von Chromsäure kam nicht in Betracht, da nach *Messinger*[1]) viele organische Substanzen bei der Verbrennung mit Chromsäure teilweise CO bilden. Am geeignetsten schien uns die Verwendung von Wasserstoffsuperoxyd, besonders für Eiweißstoffe, da es nach den Untersuchungen von *G. Botstiber*[2]) im hiesigen Laboratorium basische Eiweißsubstanzen und Peptide unter teilweiser Desamidisierung und Hydrolyse in einzelne Aminosäuren sehr kräftig angreift. Während aber die Aminosäuren durch $KMnO_4$ leicht verbrannt werden, sind sie gegen Wasserstoffsuperoxyd ziemlich resistent. Auch greift nach *G. Botstiber*[2]) das Wasserstoffsuperoxyd die Eiweißstoffe an ganz anderen Stellen an als das Permanganat. Um die Stärke und Grenzen der Oxydationsfähigkeit von Wasserstoffsuperoxyd zu finden, wurde eine Reihe Substanzen mit Wasserstoffsuperoxyd behandelt (Tabelle III). Die Verbrennungen wurden mit der vorher angegebenen Apparatur ausgeführt.

Wir verwendeten das Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung, da vorgenommene Versuche die stärkere Oxydationsfähigkeit in alkalischer Lösung ergaben. Im Kolben befand sich die Substanz plus 100 bis 150 ccm destillierten Wassers, durch den Tropftrichter wurden 10 bis 12 ccm n/4 $NaOH$ von bekanntem CO_2-Gehalt zugegeben. Die Zugabe von Wasserstoffsuperoxyd geschah bei allen Substanzen, mit Ausnahme der Eiweißsubstanzen, in Mengen von 20 ccm und in Abständen von je 10 Minuten. War die gewünschte Zeit erreicht, so wurden 5 ccm einer 10proz. Schwefelsäure durch den Tropftrichter zugegeben und weitere 10 Minuten gekocht. Bei den Eiweißstoffen geschah die Zugabe auf folgende Weise: Die mit 5 bis 10 ccm n/4 $NaOH$ versetzte Eiweißlösung wurde 10 Minuten gekocht, dann wurden 30 ccm Wasserstoffsuperoxyd in Mengen von 1 bis 3 ccm im Laufe von 15 bis 20 Minuten bei kleiner Flamme durch den Tropftrichter zugelassen, um ein zu starkes Schäumen zu vermeiden.

---

[1]) Ber. **23**, 2718, 1890.
[2]) Diese Zeitschr. **174**, 69, 1926.

Tabelle III.

Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd.

Art und Menge der Substanz	Verbrennungsdauer	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert in Proz. des berechneten
Casein				
0,0896	0h30'	28,70	2,00	6,9
0,0271	3	21,62 n/10	6,14 n/10	28,4
0,1208	1 30	38,70	4,65	12,0
0,1171	1	37,76	3,00	8,0
Globulin				
0,0782	1	27,25	4,40	16,0
0,1252	1	43,80	6,35	14,5
Asparagin				
0,1174	0 30	37,50	12,10	32,0
0,0869	0 30	23,30	6,85	29,5
Salicylsäure				
0,1256	0 30	50,00	17,00	34,0
0,1325	0 30	53,80	11,05	28,0
Stearinsäure				
0,1045	1	52,94	3,10	5,8
0,0956	1	48,45	3,00	6,2
Nitranilin				
0,1062	0 30	36,85	7,60	20,6
0,0782	0 30	27,20	6,54	24,0
Chloranil				
0,0952	0 30	23,90	7,50	31,4
0,1056	0 30	26,50	8,80	33,3
Hydrochinon				
0,0968	1 30	42,20	20,80	49,8
0,1008	0 30	43,95	8,80	20,0
Diphenylcarbazid				
0,0852	0 30	36,60	13,50	37,0
0,0670	0 30	28,80	10,10	35,0
2-Oxychinolin				
0,0658	1	32,64	15,50	47,5
0,0782	1	38,80	16,40	48,5
Chinolin				
0,1205	0 40	67,20	2,50	3,7
0,0956	1	53,31	2,40	4,5
Strychnin				
0,0572	0 40	28,77	0,78	2,7*)
0,1977	1 30	99,45	4,70	4,7
Strychninnitrat				
0,0601	0 30	25,50	2,50	9,0
0,0328	0 40	13,90	1,54	11,0
Pyridin				
0,1256	0 40	64,43	3,50	5,3
0,0892	0 40	45,76	2,20	4,8
Naphthalin				
0,0895	1	46,73	0,85	1,6
0,1045	1	54,36	0,82	1,5

*) Das Strychnin wurde trotz seiner Unlöslichkeit von Wasserstoffsuperoxyd angegriffen.

Tabelle III (Fortsetzung).

Art und Menge der Substanz	Verbrennungsdauer	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert in Proz. des berechneten
α-Naphthol				
0,0592	0h30′	33,32	8,80	26,5
0,0852	0 30	48,20	12,05	25,0
Morphin				
0,0563	0 30	25,25	3,02	12,0
0,0358	0 30	16,60	2,03	14,3
Dimethylamidobenz-aldehyd				
0,1023	0 30	50,74	7,85	15,5
0,0565	1 30	26,03	10,15	39,0
Thebain. hydrochloric.				
0,0956	0 30	41,78	1,20	2,8
0,1152	0 30	50,35	1,25	2,5

Es wurden außer den in der Tabelle angegebenen Substanzen auch Thymol, Chininbisulfat, Coffein, Campher, Dimethylamidoantypirin, Indoxylsäure und andere untersucht. Auch diese Stoffe wurden vom Wasserstoffsuperoxyd mehr oder weniger stark angegriffen. Die größere oder geringere Oxydierbarkeit der einzelnen Stoffe lassen sich nur mit Strukturunterschieden erklären. So bewirkt auch hier die Einführung einer Hydroxylgruppe in eine zyklische Verbindung leichtere Oxydierbarkeit, so z. B. α-Naphthol und 2-Oxychinolin im Gegensatz zu Naphthalin und Chinolin. Die Unlöslichkeit der Substanz in Wasser vermindert ihre Oxydierbarkeit, so z. B. bei Strychnin im Gegensatz zum Strychninnitrat. Am wenigsten oxydierbar sind aromatische und heterozyklische Verbindungen, die nicht substituiert sind, wie Pyridin, Naphthalin und andere. Die Einführung von Methylgruppen bewirkt ebenfalls eine Verminderung der Oxydationsfähigkeit, so z. B. bei Thebain im Gegensatz zum Morphin.

Verbrennungen mit 3proz. H_2O_2 und $KMnO_4$.

Wir gingen nun dazu über, die Substanzen mit Wasserstoffsuperoxyd und Kaliumpermanganat zu verbrennen. Die Verbrennung wurde in der Weise ausgeführt, daß die Substanz 30 Minuten mit Wasserstoffsuperoxyd auf die vorher angegebene Weise behandelt wurde, dann wurden 50 ccm Kaliumpermanganat durch den Tropftrichter zugefügt und weiter erhitzt. Parallel mit der Wasserstoffsuperoxyd- und Kaliumpermanganatverbrennung wurde die Substanz nur mit Kaliumpermanganat allein verbrannt, und nach gleicher Zeit wurden in beiden Peligots der Kohlenstoffgehalt bestimmt. Auf diese Weise konnte die schnellere Verbrennbarkeit nach der einen oder anderen Methode kontrolliert werden (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Verbrennungen mit H_2O_2 und $KMnO_4$.

Art und Menge der Substanz	Verbrennungsdauer	Oxydans	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert in Proz. des berechneten
Strychninnitrat					
0,0856	1h10′	H_2O_2 u. $KMnO_4$	36,32	29,70	82,0
0,0469	1 10	$KMnO_4$	19,90	19,10	95,9
0,0957	1 30	H_2O_2 u. $KMnO_4$	44,60	37,50	92,3
0,0575	1 30	$KMnO_4$	24,38	24,25	99,5
Cumarin					
0,0698	1 30	H_2O_2 u. $KMnO_4$	34,42	34,55	100,3
0,0770	1 30	$KMnO_4$	38,96	38,35	98,6
Morphin					
0,0956	1 30	H_2O_2 u. $KMnO_4$	42,88	32,80	76,5
0,0852	2	H_2O_2 u. $KMnO_4$	38,20	38,28	100,2
0,0586	1 30	$KMnO_4$	26,28	26,23	99,8
Chininbisulfat					
0,1045	2 30	H_2O_2 u. $KMnO_4$	29,05	26,17	93,5
0,0608	2 30	$KMnO_4$	16,90	17,00	100,3
0,0635	2	H_2O_2 u. $KMnO_4$	17,76	12,42	69,0
0,0861	2	$KMnO_4$	23,90	23,13	97,0
Casein					
0,0582	3	H_2O_2 u. $KMnO_4$	18,92	18,25	97,0
0,0958	3 30	H_2O_2 u. $KMnO_4$	30,60	30,50	99,7
0,0924	3 30	$KMnO_4$	29,68	26,80	90,3
Globulin					
0,0586	3	H_2O_2 u. $KMnO_4$	20,00	20,05	100,2
0,1235	2 30	H_2O_2 u. $KMnO_4$	42,10	40,20	97,2
0,0853	3	$KMnO_4$	29,10	23,30	80,0

Es zeigte sich, daß bei den Eiweißstoffen die Vorbehandlung mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung eine starke Verminderung der Verbrennungszeit bewirkt. Bei allen übrigen untersuchten Substanzen (mit Ausnahme des Cumarins, das gleiche Verbrennungszeiten nach beiden Methoden zeigte) war die Dauer der Verbrennung mit Kaliumpermanganat allein kürzer als mit Wasserstoffsuperoxyd und Kaliumpermanganat. Um zu sehen, ob die kürzere Verbrennbarkeit der Eiweißstoffe durch das Alkali oder Wasserstoffsuperoxyd verursacht wird, wurden Versuche in der Weise ausgeführt, daß Eiweißstoffe zum Teil 30 Minuten mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung, zum Teil 30 Minuten nur mit Alkali erhitzt wurden und dann beide mit $KMnO_4$ behandelt wurden. Bei anderen Versuchen wurden Eiweißstoffe mit Wasserstoffsuperoxyd in saurer Lösung 30 Minuten lang gekocht und dann erst mit Kaliumpermanganat behandelt (Tabelle V).

Diese Versuche ergaben, daß die kürzere Verbrennungszeit der Eiweißstoffe sowohl durch die Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd wie auch durch die Hydrolyse der alkalischen Lösung bedingt ist.

Tabelle V.

Art und Menge der Substanz	Verbrennungsdauer	Oxydans	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert in Proz. des berechneten
Casein					
0,0948	2h	30' m. Alkali gek., dann $KMnO_4$	30,27	24,08	75,7
0,0852	2		27,50	21,40	76,8
0,0565	2	H_2O_2 u. $KMnO_4$	18,09	16,80	92,7
0,0823	2		26,36	24,12	91,5
0,0582	3		18,92	18,55	98,5
0,1052	3		33,70	28,00	83,0*)
0,0685	4		21,94	22,10	100,6*)
Globulin					
0,0552	2	30' m. NaOH gek., dann $KMnO_4$	18,82	15,25	81,0
0,1205	2	H_2O_2 u. $KMnO_4$	42,10	38,25	93,0
0,0942	3		32,02	32,00	99,9

*) Das H_2O_2 in saurer Lösung.

Die Wirkung der Katalysatoren auf die Verbrennungszeit.

Wir gingen nun dazu über, die Wirkung der Katalysatoren auf die Verbrennung zu untersuchen. Als Maßstab diente die bei einer Verbrennung mit und ohne Katalysatoren in der gleichen Zeit und bei der gleichen Substanz gefundenen C-Werte in Prozenten. Die Verwendung von Eisen-, Nickel- und Kupfersulfat fiel weg, da ihre Unwirksamkeit bei der Verbrennung schon von *E. Freund* und *G. Botstiber*[1]) erwiesen wurde. Wir gebrauchten als Katalysatoren metallisches Quecksilber, $HgO(SO_4)$, Platinblech (20 : 40 mm) und Platinnetz (Größe 90 : 95 mm), welches zwecks bequemerer Handhabung dreifach zusammengelegt (3a : 95 mm) und etwas U-förmig ausgebogen wurde. Dadurch konnte es ohne besondere Schwierigkeiten nach der Verbrennung aus den Kolben entfernt werden. Das Platinnetz wurde nach jeder Verbrennung mit Oxalsäure und destilliertem Wasser gereinigt und im Bunsenbrenner ausgeglüht. Die Eiweißstoffe wurden vor der Verbrennung mit Kaliumpermanganat 30 Minuten mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung (in Gegenwart der Katalysatoren) behandelt (Tabelle VI).

Die Verbrennungen ergaben die Wirksamkeit aller verwendeten Katalysatoren, doch in sehr verschiedenem Grade. Am schwächsten wirkte $HgO(SO_4)$, metallisches Quecksilber (das nach der Verbrennung als HgO vorhanden war), am stärksten das Platinnetz, das eine größere Verkürzung der Verbrennungszeit bewirkte. Wir konnten bei anderen Versuchen eine ähnliche oxydationsfördernde Wirkung des Platins bei Verbrennungen mit Wasserstoffsuperoxyd beobachten. Im Falle wir

[1]) Diese Zeitschr. **136**, 145, 1923; **174**, 69, 1926.

Tabelle VI. Verbrennungen in Gegenwart von Katalysatoren.

Art und Menge der Substanz	Verbrennungszeit	Oxydans	Katalysator	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefund. Wert in Proz. des berechneten
Chininbisulfat						
0,0608	1h	$KMnO_4$	$HgO(SO)_4$	16,90	13,85	82,0
0,0901	1	"	Hg	25,05	21,30	85,0
0,0858	1 50′	"	"	23,85	23,75	99,6
0,0928	1	"	—	25,80	19,45	71,5
0,0639	2 30	"	—	17,76	17,70	99,7
0,0789	1	"	Pt-Blech	21,23	19,53	92,0
0,0922	1 30	"	"	25,64	25,75	100,0
0,0857	1	"	Pt-Netz	23,75	23,20	97,5
0,01212	1	"	"	33,69	31,85	95,0
0,0978	1 30	"	"	27,12	27,10	100,0
0,0936	1 30	"	"	26,02	25,85	99,3
Strychninnitrat						
0,0852	0 30	"	Hg	36,12	29,45	81,5
0,0658	0 30	"	Pt-Blech	27,90	23,45	84,0
0,0782	0 30	"	Pt-Netz	33,15	30,55	92,3
0,0952	0 30	"	—	40,35	30,20	75,0
0,0875	1	"	Pt-Netz	37,10	37,25	100,4
0,0892	1	"	—	37,82	35,40	93,0
Casein						
0,0541	1 30	H_2O_2 u. $KMnO_4$	Hg	17,33	10,77	62,1
0,0823	1 30	" " "	"	26,36	17,93	68,0
0,0519	1 30	" " "	$HgO(SO)_4$	16,62	7,00	42,3
0,0582	1 30	" " "	—	18,64	6,35	34,0
0,0759	1 30	" " "	—	24,34	9,75	40,2
0,0864	1 30	" " "	Pt-Blech	27,64	20,95	76,0
0,1005	1 30	" " "	Pt-Netz	32,20	26,70	86,0
0,0955	1 30	" " "	"	30,60	25,25	82,5
0,0821	1 30	" " "	"	26,30	23,72	90,2
0,1203	2	" " "	"	38,34	38,33	99,5
0,1302	2	" " "	"	40,70	39,72	97,7
0,0884	2 15	" " "	"	28,30	28,40	100,3

Eiweißstoffe ohne Vorbehandlung mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung nur mit Kaliumpermanganat und Platinnetz als Katalysator verbrannten, wurde die Verbrennungszeit ebenfalls verkürzt, doch weniger als bei der Vorbehandlung mit Wasserstoffsuperoxyd. Die Verbrennungszeiten waren ohne Vorbehandlung mit Wasserstoffsuperoxyd bei Casein und Trockenserum 4 Stunden, bei Globulin 3½ Stunden.

Der Einfluß der Konzentration des $KMnO_4$ und H_2SO_4 auf die Verbrennung.

Die Verkürzung der Verbrennungszeit durch Steigerung der Konzentration des Kaliumpermanganats und der Schwefelsäure, ergab als Grenze der Konzentrationssteigerung für Kaliumpermanganat 6 Proz. (ist gleich der Löslichkeit im Wasser bei 15⁰ C), für die Schwefelsäure

10 bis 12 Proz. Eine darüber hinausgehende Konzentration der Schwefelsäure ergab, abgesehen von stärkerem Kaliumpermanganatverbrauch (400 bis 700 ccm einer 6proz. Lösung), oft eine, wenn auch geringe, Kohlenoxydentwicklung bei der Verbrennung, so daß bei einer Steigerung der Schwefelsäurekonzentration über 12 Proz. die Einschaltung einer Verbrennungsröhre notwendig wäre, wodurch die Einfachheit der Methodik leiden würde. Es wurde nun unter Berücksichtigung der oben angeführten Konzentrationsgrenzen eine Reihe von Verbrennungen mit wechselndem Permanganat- und Schwefelsäuregehalt ausgeführt. Die Permanganatlösung enthielt 6 Proz. Kaliumpermanganat, 5 Proz. Natriumsulfat, 1 Proz. Schwefelsäure, sie wurde vor der Verwendung 5 bis 7 Stunden am Wasserbad gekocht. Die weitere zur Steigerung der Konzentration notwendige Schwefelsäure wurde als 50proz. durch den Tropftrichter zugegeben. Für eine Verbrennung waren 200 bis 300 ccm Permanganatlösung notwendig (Tabelle VII).

Diese Verbrennungen ergeben, daß ein Maximum der Wirkung bei 5- bis 6proz. Kaliumpermanganat und 8- bis 10proz. Schwefelsäure

Tabelle VII.

Verbrennungen mit wechselnden $KMnO_4$- und H_2SO_4-Konzentrationen.

Art und Menge der Substanz	Verbrennungszeit	Konzentration der $KMnO_4$ und H_2SO_4	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert Proz. n/4 NaOH	Gefund. Wert in Proz. des berechneten
Chininbisulfat					
0,0915	1h	3 proz. $KMnO_4$, 1 proz. H_2SO_4	25,44	20,35	80,0
0,0938	1	6 " " 1 " "	26,07	22,90	87,3
0,1002	2	6 " " 1 " "	28,35	28,00	98,9
0,0879	1	6 " " 1 " "	24,45	22,25	91,0
0,0571	1	6 " " 5 " "	15,87	14,85	93,4
0,0861	1	6 " " 10 " "	23,93	23,42	98,0
0,0902	1 30′	6 " " 8 " "	25,07	25,10	100,1
0,1014	1	6 " " 10 " "	28,19	27,40	97,3
0,0984	1 30	6 " " 10 " "	27,35	27,40	100,2
0,0582	2 30	6 " " 1 " "	16,18	16,20	100,0
Benzoesäure					
0,0524	1	6 " " 1 " "	24,05	21,30	89,0
0,0821	1	6 " " 5 " "	43,02	36,56	85,0
0,0855	1	6 " " 8 " "	44,80	42,65	96,8
0,0688	1	6 " " 10 " "	36,05	34,25	95,0
0,0324	1 30	6 " " 8 " "	17,00	16,92	99,6
0,0452	1 30	6 " " 10 " "	25,36	25,42	100,2
0,0622	2 30	1 " " 1 " "	36,26	36,15	99,7
Strychninnitrat					
0,0692	1	5 " " 1 " "	29,34	27,85	95,0
0,0756	1	5 " " 8 " "	32,05	31,90	99,6
0,0877	1	6 " " 8 " "	37,20	37,35	100,4
0,0587	1	1 " " 1 " "	24,90	21,42	90,0
0,0868	1 30	1 " " 1 " "	36,80	36,62	99,4

stattfindet. Bei dieser Konzentration findet die größte Verringerung der Verbrennungszeit statt.

Eiweißstoffe wurden zum Teil mit 6proz. Permanganat und 8proz. Schwefelsäure, zum Teil 30 Minuten mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung erhitzt und dann erst mit 6proz. Kaliumpermanganat und 8proz. Schwefelsäure weiter verbrannt. Der Gang der Verbrennung war in diesem Falle folgender: Die Substanz wurde mit 5 bis 10 ccm n/4 NaOH und 30 ccm Wasser 10 Minuten erhitzt, dann mit Wasserstoffsuperoxyd wie oben angeführt behandelt. Nach 30 Minuten wurden durch den Tropftrichter 200 ccm einer 6proz. Permanganat- und 8proz. Schwefelsäurelösung zugelassen und weiter erhitzt (Tabelle VIII).

Auch hier ergab sich eine kürzere Verbrennungszeit für die mit Wasserstoffsuperoxyd vorbehandelten Eiweißstoffe, wenn auch die Steigerung der Konzentration eine gewisse Verkürzung der Verbrennungszeit gegenüber der nur mit verdünnter Kaliumpermanganatlösung behandelten Substanzen ergibt.

Wir versuchten nun, sowohl durch Steigerung der Konzentration der Permanganatlösung, wie auch durch Anwendung von Katalysatoren, eine weitere Verkürzung der Verbrennungszeit zu erreichen. Als Katalysatoren verwendeten wir metallisches Quecksilber und Platinnetz. Es ergab sich aber, daß konform der Steigerung der Konzentration der

Tabelle VIII.

Verbrennung von Eiweißstoffen mit 6proz. $KMnO_4$ und 8proz. H_2SO_4 mit und ohne Vorbehandlung mit Wasserstoffsuperoxyd.

Art und Menge der Substanz	Verbrennungszeit	Oxydans	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefund. Wert in Proz. des berechneten
Casein					
0,0639	1 h	6 proz. $KMnO_4$, 8 proz. H_2SO_4	20,67	17,55	85,0
0,0853	2	6 „ „ 8 „ „	27,32	25,13	92,0
0,1025	3	6 „ „ 8 „ „	32,85	31,65	96,5
0,0595	4	6 „ „ 8 „ „	19,06	19,05	100,0
0,0586	1	H_2O_2 u. 6 „ „ 8 „ „	18,77	14,40	76,0
0,0837	1 30	„ „ 6 „ „ 8 „ „	26,80	25,40	95,0
0,1208	1 30	„ „ 6 „ „ 8 „ „	38,72	36,20	93,5
0,0885	2	„ „ 6 „ „ 8 „ „	28,35	28,25	99,7
0,0731	2	„ „ 6 „ „ 8 „ „	25,37	24,20	95,8
0,0589	2 30	„ „ 6 „ „ 8 „ „	18,85	18,80	99,7
0,1235	2 30	„ „ 6 „ „ 8 „ „	38,55	38,80	100,7
0,1039	2 30	„ „ 6 „ „ 8 „ „	31,48	31,55	100,2
Globulin					
0,0783	1 30	6 „ „ 8 „ „	27,48	21,90	79,6
0,1305	1 30	„ „ 6 „ „ 8 „ „	44,50	40,25	90,5
0,0735	2	„ „ 6 „ „ 8 „ „	25,06	24,35	97,2
0,1022	2	„ „ 6 „ „ 8 „ „	34,85	34,55	99,2
0,0892	2 30	„ „ 6 „ „ 8 „ „	30,42	30,30	99,7

Kaliumpermanganatlösung eine Verminderung der katalytischen Wirkung des Quecksilbers und des Platins eintritt, so daß bei 6proz. Kaliumpermanganat und 8proz. Schwefelsäure die Wirkung fast Null ist.

Es stehen uns also zwei Wege zur Verfügung, um die Verbrennung der organischen Stoffe auf nassem Wege durchzuführen. Der eine durch Verwendung einer 6proz. Kaliumpermanganat-, 8proz. schwefelsauren Lösung, der andere durch Anwendung einer verdünnten Kaliumpermanganatlösung und Platinnetz als Katalysator. Der Vorteil der zweiten Methode ist der sehr geringe Kaliumpermanganatverbrauch (30 bis 40 ccm), doch fällt die Notwendigkeit eines Platinnetzes sehr ins Gewicht. Wir führten nun, um die Grenzen ihrer Wirksamkeit zu

Tabelle IX.

Verbrennungen mit 6proz. $KMnO_4$ und 8proz. H_2SO_4 (s. auch Tabelle VII).

Art und Menge der Substanz	Verbrennungszeit	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert in Proz. des berechneten
Asparagin				
0,0648	1h	20,35	18,51	90,9
0,1230	1 30′	38,62	38,50	99,7
0,1302	1 30	40,88	40,58	99,3
0,0952	1 30	29,90	30,01	100,3
Tyrosin				
0,0856	0 30	34,01	28,98	85,0
0,1284	0 30	51,03	45,63	89,4
0,0835	1	33,15	32,22	97,2
0,1023	1 30	40,61	40,30	99,3
0,0495	1 30	19,65	19,47	99,1
o-Oxychinolin				
0,0958	0 30	47,42	40,78	86,0
0,0682	0 30	33,83	29,80	88,2
0,1032	0 45	51,20	50,33	98,3
0,0863	1	42,80	42,54	99,4
0,0622	1	30,85	31,08	100,6
Chinolin				
0,0852	1	47,52	33,70	62,5
0,0735	1 30	40,99	36,95	90,3
0,1223	2	68,76	67,40	98,0
0,0532	2 30	29,67	29,45	99,3
0,0738	2 30	46,57	46,85	100,5
Pyridin				
0,0403	1	20,72	6,65	32,1
0,0852	2	43,80	35,12	80,2
0,1053	2 30	54,12	50,15	92,7
0,0755	2 30	39,71	38,12	96,1
0,0625	3	32,13	32,07	99,8
0,1202	3	61,78	61,28	99,2
Chininbisulfat				
0,0772	0 30	21,46	16,75	78,0
0,1052	1	29,25	29,18	99,2
0,1201	1	33,40	31,55	94,5
0,0621	1 30	17,26	17,30	100,2

Tabelle X.

Verbrennungen mit verdünnter $KMnO_4$ und Platinnetz als Katalysator.
(Siehe auch Tabelle VI.)

Art und Menge der Substanz	Verbrennungszeit	Berechneter Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert ccm n/4 NaOH	Gefundener Wert in Proz. des berechneten
Asparagin				
0,0932	0h30′	29,26	21,90	68,0
0,1305	1	40,98	38,94	95,2
0,0852	1 30	26,75	26,53	99,2
0,1032	1 30	32,40	32,27	99,6
Benzoesäure				
0.1136	0 30	52,14	21,12	40,5
0,0608	1	27,90	18,52	66,7
0,0720	1 30	33,04	32,95	99,8
0,0314	1 30	14,42	14,06	97,5
0,1012	1 45	50,58	50,90	100,6
2-Oxychinolin				
0.1104	0 30	54,76	48,30	88,2
0,0832	0 30	41,27	37,48	91,1
0,0416	0 45	20,65	20,35	98,8
0,1076	1	53,37	53,25	99,8
0,0785	1	38,94	39,25	100.8
Chinolin				
0,0835	1	46,56	30,60	65,7
0,0742	2	41,38	39,55	95,6
0,1023	2 30	57,05	56,60	99,2
0,0877	2 30	48,92	48,58	99,3
Pyridin				
0,1014	1	52,12	30,02	42,9
0,0502	2	25,80	21,90	84,9
0,0835	2 30	42,92	41,20	96,0
0,0682	3	32,52	32,75	100,6
0.1381	3	70,98	70,40	99.2
Tyrosin				
0,0426	0 30	16,96	15,78	90,3
0,0812	0 30	32,34	30,15	93,2
0,1055	1	41,88	41,50	99,1
0,0866	1	43,38	34,62	100,7
Chininbisulfat				
0,0852	0 30	23,68	19,65	83,0
0,0465	1	13,03	12,78	98,2
0,0825	1	22,93	22,10	99,2
0,1346	1 15	37,42	37,32	99,8
Globulin (mit H_2O_2 und $KMnO_4$)				
0,0568	1	19,94	14,96	75,0
0,1135	1 30	39,84	38,50	96,2
0,0853	1 30	29,94	26,42	95,3
0,1085	2	33,58	33,32	99,2
0,0931	2	32,68	32,85	100,5

erproben, eine Reihe von Verbrennungen nach beiden Methoden durch (Tabellen IX und X).

Die Verbrennungszeiten nach beiden Methoden zeigen keine großen Differenzen bei den einzelnen Substanzen. Der Stickstoff der organischen Substanzen wird in den Verbrennungsrückständen nach beiden Methoden als NO_3 und NH_3 gefunden (nachgewiesen mit Diphenylamin und Neßler). Chlorhaltige, organische Stoffe müssen mit verdünnter Kaliumpermanganatlösung ohne Katalysatoren verbrannt werden (siehe Tabelle II), da bei der Verbrennung mit Platin, das Platin vom Chlor angegriffen wird; bei Verwendung von konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumpermanganat fällt ein Teil des Silbernitrats als Silbersulfat aus und wird dadurch für die Chlorbindung unwirksam. Bei der Verbrennung von flüchtigen Substanzen wird nur die Menge der verbrannten Substanz gesteigert (in Prozenten), so z. B. bei Naphthalin bis 88 Proz.

Zusammenfassend können wir sagen, daß es uns gelungen ist, entweder durch Steigerung der Konzentration des Permanganats und der Schwefelsäure, oder durch Verwendung von Platinnetz als Katalysator eine starke Verkürzung der Verbrennungszeit auf 1 bis 3 Stunden zu erreichen. Bei Eiweißstoffen ist eine Vorbehandlung mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung notwendig. Für chlorhaltige Substanzen ist eine Zugabe von Silbernitrat zur verdünnten Permanganatlösung während der Verbrennung notwendig. Während der Verbrennung mit Kaliumpermanganat bedarf die Apparatur fast keinerlei Aufsicht. Reihenbestimmungen können durch Verwendung von mehreren Apparaturen ohne besondere Mehrarbeit durchgeführt werden.

Wir glauben für alle die Fälle, bei denen nur der Kohlenstoffgehalt gebraucht wird, besonders für die Bestimmungen von wässerigen Lösungen von Phosphor, Schwefel und halogenhaltigen Stoffen, eine relativ einfache und leicht verwendbare Methode der Kohlenstoffbestimmung auf nassem Wege ausgearbeitet zu haben.

Untersuchungen über den Jodstoffwechsel. III.

Von

Th. von Fellenberg.

(Aus dem Laboratorium des schweizerischen Gesundheitsamtes.)

(Eingegangen am 12. Februar 1927.)

Es wurde an mehreren Fällen nachgewiesen[1]), daß die Bewohner kropffreier Gegenden im allgemeinen mehr Jod mit dem Harn ausscheiden als die Bewohner von Gegenden mit Kropfendemie. So wurden als durchschnittliche Ausscheidung während 24 Stunden in den aargauischen Dörfern Kaisten (Kropf) 19, Hunzenschwil (Kropf) 17, Effingen (kropffrei) 64 γ gefunden. In Forte dei Marmi an der liguuischen Küste fand man 72 γ oder, unter Ausschaltung der zugereisten Personen und der Kinder, 112 γ im Durchschnitt.

Durch die Vermittlung von Herrn Dr. *Gulbrand Lunde* wurde es mir ermöglicht, eine Anzahl Harne von Sognefjord, Norwegen, zu erhalten. Sie wurden mir in dankenswerter Weise durch Herrn Dr. *J. C. Holst* in Vik i Sogn besorgt.

Vik i Sogn liegt am südlichen Ufer des Sognefjords, ungefähr 100 km von der Westküste Norwegens entfernt. Die drei Höfe, auf welchen die Versuchspersonen leben, sind alle ungefähr 30 Minuten vom Fjord entfernt. Der gewöhnliche Kropf kommt in dieser Gegend nicht vor.

Die ausgewählte Gegend mag vielleicht in bezug auf den Jodstoffwechsel ungefähr dem Durchschnitt von Norwegen entsprechen. Das Wasser des Fjords ist trotz der großen Entfernung vom Meer infolge gewisser Strömungsverhältnisse salzreicher als dasjenige der Ostsee. Die Fische sind somit Meerfische und als solche jodreich. Indessen spielt die Fischernährung in jener Gegend nicht gerade eine große Rolle.

Als Versuchspersonen wurden aus früher dargelegten Gründen nur Männer gewählt. Es wurden überall Nachtharne unter genauer Feststellung der Zeit der Nachtruhe verwendet, und zwar wurde der Harn des morgens, teilweise in der Wohnung von Herrn Dr. *Holst*,

---

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 150, 1924; **174**, 341, 1926.

aufgefangen und gemessen. Aus der nächtlichen Jodausscheidung wurde diejenige von 24 Stunden berechnet, unter der annähernd zutreffenden Voraussetzung, daß in gleichen Zeiten gleiche Jodmengen ausgeschieden werden. Herr Dr. *Holst* machte mir ferner genaue Angaben über den Gesundheitszustand der Versuchspersonen, über die Art ihrer Ernährung am vorhergehenden Tage (in den meisten Fällen) und über die Art ihrer Beschäftigung, ob schwere oder leichte Arbeit geleistet worden war. Letztere Angabe erfolgte, weil durch schwere körperliche Anstrengung, verbunden mit starkem Schwitzen, ein sehr erheblicher Anteil des im Stoffwechsel ausgeschiedenen Jods in den Schweiß gelangt und somit für den Urin verloren geht.

Da die Fischnahrung für den Nordländer im allgemeinen sehr wichtig ist und auch für unsere Versuchsgegend durchaus nicht vernachlässigt werden darf, wurden einige in Oslo gekaufte getrocknete Fische auf Jod untersucht. Ich verdanke das Material der Zuvorkommenheit von Herrn Dr. *Lunde*.

Zwei Haupttypen der getrockneten Fische bilden der Stockfisch, der seinen Namen davon her hat, daß er in ungesalzenem Zustande auf Stöcken getrocknet wird, und der Klippfisch, welcher eingesalzen und auf Felsen getrocknet wird. Ich untersuchte zwei Sorten Stockfisch und eine Sorte Klippfisch. Die Zahlen beziehen sich auf den eßbaren Anteil ohne größere Gräte. Die Resultate sind folgende:

1. Rodskjaer (Törfisk) = Stockfisch, Dorsch, aus Nordland, Norwegen, getrocknet, ungesalzen.

Fischfleisch, ohne Haut	10100 γ J im Kilogramm
Haut	20500 γ J ,, ,,
Fisch mit Haut	12100 γ J ,, ,,

2. Törfisk (Sei) = Stockfisch (Köhler), aus Nordland, getrocknet, ungesalzen . . 7700 γ J im Kilogramm.

3. Klipfisk = Klippfisch, Dorsch, aus Arendal, südliches Norwegen, gesalzen, 22 Proz. NaCl.

Der Fisch wurde über Nacht mit der sechsfachen Menge kalten Wassers ausgelaugt.

Man fand im ausgelaugten Fisch .	7700 γ J im Kilogramm
im wässerigen Auszug .	790 γ J ,, ,,

Wir wissen von vornherein noch nicht, ob die außerordentlich hohen Jodgehalte durch den Menschen ausnutzbar sind, ob es sich nicht vielleicht größtenteils um unresorbierbares Jod handelt.

Beim Klippfisch wurde in der wässerigen Lösung auf anorganisches Jod geprüft und 202 γ im Kilogramm gefunden, also nur ein Drittel des wasserlöslichen oder etwa 3 Proz. des Gesamtjods. Es liegt nahe, an-

zunehmen, daß beim Salzen der Fische das anorganische, überhaupt das lösliche Jod größtenteils ausgelaugt wird.

Ich untersuchte nun den Törfisk Nr. 2 eingehend. Das Material wurde in einem Stück mit der zehnfachen Menge Wasser 16 Stunden stehengelassen. Der Rückstand wurde für sich untersucht; in der wässerigen Lösung wurde eine Trennung in einzelne Fraktionen ausgeführt, wie sich dies aus der folgenden Zusammenstellung ergibt.

Ausgewässerter Fisch	2500 γ J im Kilogramm
Wässerige Lösung:	
Alkoholunlöslicher Teil (gelöstes Eiweiß)	530 γ J „ „
Alkohollöslicher Teil:	
Mit $CHCl_3$ aus saurer Lösung extrahierbar	470 γ J „ „
Anorganisch gebunden	1800 γ J „ „
Rest	1800 γ J „ „
Summe	7100 γ J im Kilogramm

Das lösliche Jod macht hier 65 Proz. des gesamten aus, das anorganische 23 Proz. oder wieder ein Drittel des löslichen. Dies bestätigt, daß beim Einsalzen des Klippfischs wirklich starke Verluste an löslichem Jod erfolgt sind.

Vom anorganischen Jod wissen wir, daß es leicht resorbiert wird und sich in aktiver Form im Kreislauf betätigt. Für die verschiedenen organischen Jodverbindungen, welche im Fischkörper vorhanden sind, müßte dies erst noch erwiesen werden. Jedenfalls zeigen unsere Resultate, daß bei Fischnahrung große Jodmengen aufgenommen werden können.

Wenden wir uns nun den Harnuntersuchungen zu. Die Bestimmungsmethode war folgende:

10 ccm Harn werden in einer flachen Eisenschale von 10 cm Durchmesser mit 1 ccm gesättigter Pottaschelösung versetzt und vorsichtig eingedampft. Man erhitzt bei langsam gesteigerter Temperatur mit einem Pilzbrenner allmählig bis auf etwa 400° (Schmelzpunkt des Zinks). Man kühlt ab, befeuchtet mit Wasser, dampft zur Trockne und erhitzt wieder einige Minuten auf die genannte Temperatur. Man befeuchtet wieder mit Wasser, setzt einen Tropfen 10proz. Natriumnitratlösung zu und erhitzt nochmals. Die Hauptmenge der organischen Substanz ist nun verbrannt, die Hauptmenge des Jods in alkohollösliche Form übergeführt. Man extrahiert mehrmals mit Alkohol, löst den Rückstand wieder in Wasser, setzt noch einige Tropfen Nitratlösung zu und erhitzt nochmals, diesmal etwas höher, bis zur eben beginnenden leichten Rotglut bzw. bis der Salzrückstand rein weiß ist. Nun extrahiert man wieder mehrmals mit Alkohol, dampft die vereinigten Auszüge

in einer Platinschale auf dem Wasserbad ein und glüht sie schwach, aber doch deutlich. Es ist von größter Wichtigkeit, daß keine unzersetzte organische Substanz mehr bleibt. Mancherlei Fehlresultate haben mich zu der Überzeugung gebracht, daß gerade hier ein sehr wichtiger Punkt für das Gelingen oder Mißlingen der Jodbestimmung im Harn liegt. Der Harn enthält Stickstoffverbindungen, wahrscheinlich Umwandlungsprodukte der Harnsäure, welche alkohollöslich und schwer zu zersetzen sind. Solange sie in Gegenwart von Pottasche mäßig erhitzt werden, ist keine Gefahr vorhanden, daß ihre Anwesenheit zu Jodverlusten führt. Erhitzt man sie aber ohne Alkali, so bilden sie flüchtiges Ammoniumjodid; Jodverlust muß also eintreten. Daher muß dieses letzte Erhitzen in Gegenwart von Pottasche in genügender Weise erfolgen. Da sich leicht Salzkrusten nach oben biegen und der Erhitzung entziehen, befeuchtet man den Rückstand nochmals mit einigen Tropfen Wasser und glüht nochmals. Man extrahiert nun wieder mit Alkohol, dampft ein und führt die kolorimetrische und eventuell die titrimetrische Bestimmung in gewohnter Weise aus.

Die Bestimmungen wurden alle öfters wiederholt, und zwar wurden in jedem einzelnen Falle mehrere Kontrollen unter Zusatz von Jodid ausgeführt.

Die Versuchspersonen sind alles Bauern bzw. Nr. 2 ein Bauernknecht. Die Kost ist bei Nr. 1 und 2 nicht angegeben; bei Nr. 3 bis 5 besteht sie aus folgendem: Frühstück Kaffee und Butterbrot, Mittag Fleisch, Kartoffeln, Saftsuppe; nachmittags wie Frühstück, abends Gerstenbrei und Milch. Nr. 6 und 7 erhielten zum Frühstück Kaffee, Butterbrot, einheimischen Käse, Konfitüre, mittags Fisch (leicht gesalzener Brosme), Kartoffeln, Haferflockensuppe, nachmittags wie Frühstück, abends Gerstebrei und Milch. Bei Nr. 8 war die Kost folgende: Frühstück Kaffee und Butterbrot, mittags Fisch (gesalzene Pale), Kartoffeln, nachmittags wie Frühstück, abends Griesbrei.

Die übrigen Angaben, sowie die Jodgehalte der Harne finden sich in der folgenden Tabelle.

Jodgehalte von Harnen von Männern aus Vik i Sogn, November 1926.

Nr.	Alter Jahre	Wohnort	Arbeit am vorhergehenden Tage	Gesundheitszustand	In 24 Std. γ Jod
1	45	Tenold	leichte Arbeit	Verdauungsbeschwerden (Bruch)	110
2	17	Hopperstad	mittelschwere Arbeit	abgelaufene Gonorrhoe	200
3	24	Hove	leichte Arbeit	gesund	180
4	55	„	keine Arbeit	Verstreckung d. Rückens	140
5	25	„	schwere Arb., Schwitzen	gesund	96
6	62	Tenold	leichte Arbeit	„	240
7	30	„	mittelschwere Arbeit	„	107
8	50	„	leichte Arbeit	Dickdarmkatarrh	94

Im Durchschnitt beträgt der Jodgehalt 146 γ in 24 Stunden. Es ist dies der höchste Wert, den ich bis jetzt in einer Gegend gefunden habe.

Unsere Tabelle zeigt einige interessante Einzelheiten, welche frühere Befunde bestätigen. Vier Werte sind bedeutend niedriger als die übrigen und unter sich sehr ähnlich. Der niedrige Wert Nr. 5 betrifft einen Mann, der am Tage vorher schwere Arbeit leistete und stark schwitzte. Ich habe a. a. O.[1]) gezeigt, daß unter diesen Umständen sehr viel Jod durch den Schweiß ausgeschieden wird und daß der Jodgehalt des Harns dabei entsprechend niedriger werden muß. Die gesamte Jodausscheidung mag also hier sehr wohl gegen 200 γ betragen haben.

Die Versuchsperson Nr. 8 litt zur Zeit der Probeentnahme an Dickdarmkatarrh. Es wurde bereits früher gezeigt (l. c.), daß das mit der Nahrung aufgenommene Jod bei schlechter Verdauung nicht gut resorbiert wird, sondern größtenteils in den Stuhl gelangt. Bei Nr. 1 (Verdauungsbeschwerden) mag derselbe Fall eingetreten sein. Für den vierten niedrigen Wert Nr. 7 läßt sich aus den vorliegenden Angaben keine Erklärung finden. Unter Ausschaltung der drei durch äußere Umstände erklärbaren niedrigen Werte berechnet sich die durchschnittliche Jodausscheidung durch den Harn zu 173 γ. Das macht ungefähr viermal mehr aus als die Jodaufnahme durch das schweizerische, jodierte Kochsalz, die wir zu 50 γ KJ oder 40 γ J im Tage annehmen.

[1]) Diese Zeitschr. 142, 252, 1923.

Über tryptische Verdauung. IV.

Von

Rudolf Ehrenberg.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 13. Februar 1927.)

Die Untersuchungsreihe[1]), zu der die nachstehend mitgeteilten Ergebnisse die Fortführung bilden, hat als Problemstellung die Frage nach den Veränderungen, welche die tryptischen Enzyme mit ihrer Wirkung auf das Substrat erfahren und nach dem eventuellen Zusammenhang der Enzymwirkung mit diesen Veränderungen. So war gezeigt worden, daß die Konzentration an Enzym nicht nur für den zeitlichen Verlauf, sondern auch für den qualitativen Gang der Proteolyse bestimmend ist, daß bei schwächerer Enzymkonzentration der Abbau andere Wege geht als bei stärkerer, erkennbar sowohl an dem Verhältnis der frei werdenden Aminogruppen zu dem unfällbar gewordenen Stickstoff, wie auch an der Bausteinzusammensetzung der dialysabel werdenden Bruchstücke. Weiter hatte sich ergeben, daß die Enzymwirksamkeit in einem abklingenden Verdauungssystem, bestimmt jeweils in neuem Ansatz mit dem Ausgangssubstrat (Casein), nicht fortgesetzt abnimmt, sondern auch vorübergehende Wiederanstiege zeigt, nicht zu verwechseln mit dem wellenförmigen Verlauf der Verdauungsgeschwindigkeit innerhalb ein und desselben proteolytischen Prozesses. Ein anderer, mit mannigfach variierter Methodik erhobener Befund war der, daß in einem Verdauungssystem der Gehalt an dialysierfähigem Enzym zunächst mit der Zeit zunimmt — über den in der gleichen, substratfreien Enzymlösung hinaus —, um im weiteren Verlauf bei noch erhaltener hoher Enzymwirksamkeit auf Null abzusinken, daß andererseits die substratfreie Enzymlösung trotzdem in der Dialyse einen größeren Wirksamkeitsverlust erleidet als die substrathaltige. Es war aus diesen und anderen Versuchen die Möglich-

[1]) Diese Zeitschr. **149**, 269, 1924; **153**, 362, 1924; **161**, 348, 1925.

keit einer Zunahme der enzymwirksamen Konzentration bei der Einwirkung auf Substrat (oder manche Substrate) zumindest für diskutabel erklärt worden. Wahrscheinlicher schien diese Annahme weiterhin zu werden aus dem — besonders im Vergleich von Casein und Gelatine erhobenen — Befunde, daß Vorbehandlung (Verdauung) mit einem bestimmten Substrat mehr Enzymwirksamkeit gegenüber diesem übrig läßt als gegenüber anderen. Inzwischen ist die Möglichkeit der Analyse auch in der hier gewählten Problemstellung durch die Ergebnisse von *Willstätter*, *Waldschmidt-Leitz* und ihren Mitarbeitern bedeutend gefördert worden. Für einen Teil der hier angeführten Ergebnisse wird sich die Fragestellung dahin präzisieren, wie sich die von den genannten Autoren getrennten drei Komponenten des Pankreasferments bei gleichzeitiger Einwirkung und verschiedenen Gesamtkonzentrationen in die Arbeit teilen, und welche Wirksamkeitsänderung jede von ihnen dabei erfährt. Es wird ferner zu fragen sein, ob und welche genetische Beziehungen der Komponenten untereinander, eventuell unter Mitbeteiligung des Substrats bestehen, eine Möglichkeit, die aus manchen der hier erhobenen Befunde plausibel erscheint.

Diese Ausdehnung der Untersuchung auf Grund jener Forschungen steht noch aus, die nachfolgenden Ergebnisse stellen noch Erweiterungen der Methodik in anderer Richtung dar, deren Verbindung mit derjenigen, die *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz* entwickelt haben, aussichtsvoll erscheint, und die zunächst die Fragen der Zustandsänderung der Enzyme mit der Wirkungsbestätigung sowie der Konzentrationsänderung zugänglicher machen.

Versuche mit freier Diffusion.

In Diffusionsgefäßen nach Art der in „*Ostwald-Luther*, Physikochemische Messungen" (3. Aufl., S. 241) angegebenen, die bei einer Länge von 17 cm etwa 100 ccm faßten, wurden jeweils 20 ccm der enzymhaltigen Lösungen unter 80 ccm der Grundsalzlösung (m/15 Phosphatgemisch von p_H 7,7) geschichtet und in einem großen Wasserbad bei Tiefkellertemperatur — 10° — belassen. Dauer meist 8 Wochen. Entnommen wurde am Schluß in Portionen zu 20 ccm. Es wurden jeweils Reihenversuche von zwei bis vier Ansätzen angestellt, deren Unterschichtlösungen gleiche Ausgangskonzentration von Enzym enthielten, im Substratgehalt bzw. der Vorverdauungszeit variierten. Als Enzymspender diente aus dem Glycerinauszug von Schweinebauchspeicheldrüsen mit Alkohol gefälltes Trockenpräparat, das — nach Aktivierung durch zweistündiges Digerieren bei 37° und schwach saurer Reaktion — zu 5 g auf 100 ccm Phosphatlösung 24 Stunden ausgezogen, darauf die Lösung filtriert wurde. Als Substrat diente Casein-*Hammarsten* (*Merck*), in einzelnen Fällen Gelatine. In dem am Schluß entnommenen 20er Portionen wurde in vielen Fällen Gesamt- sowie Aminostickstoff (Mikrokjeldahl und Mikro-van-Slyke) bestimmt, sowie in allen Fällen folgender Verdauungsversuch angestellt: 5 ccm der Portion zu 15 ccm 4proz. Casein in der genannten Phosphat-

lösung, 37°, Proben mit n/10 HCl volumverdoppelt, *van Slyke* in 1 ccm (Mehrfachbestimmung). Die Substratkonzentration ist so hoch, daß der Substratzuwachs aus den „Portionen" als solcher keine Steigerung der Aminofreisetzung bedingt, wie Kontrollversuche bestätigten. Die Enzymkonzentrationen, auch aus den Grundportionen, sind sehr niedrig im Verhältnis zur Substratkonzentration.

Zunächst seien einige noch nicht weiter verfolgte Beobachtungen aus den Diffusionsansätzen mitgeteilt. Sowohl aus den substratfreien wie aus den caseinhaltigen (verdautes Casein!) Lösungen stiegen wenige Stunden nach der Unterschichtung scharf begrenzte Trübungsringe auf und gelangten im Laufe einiger Tage an das obere Ende. Die Ringe aus den caseinhaltigen Lösungen waren dichter und stiegen aus den konzentrierteren Lösungen früher auf, so daß die Abstände während des Anstiegs das Verhältnis der Konzentrationen wiedergaben, z. B. 4 : 2 : 1.

Aus enzymfreier, unverdauter 8proz. Caseinlösung stieg kein Ring auf, wohl aber trat hier, auch unter Berücksichtigung der Diffusion, eine beträchtliche Abnahme des säurefällbaren Caseins, Zunahme des freien Aminostickstoffs in 4 Monaten ein, ein Befund, der sich dem früher berichteten der Förderung der Caseinolyse durch Dialyseanordnung anfügt (Bakterienwirkung wurde in allen Versuchen durch Sterilisierung der Casein- und Phosphatlösungen sowie durchgängigen Zusatz von 0,3 bis 0,5proz. NaF, während der Verdauung außerdem noch von Toluol ausgeschlossen).

Die andere Beobachtung wurde bei der Unterschichtung in den Diffusionsgefäßen gemacht: diese mißlang in einzelnen Fällen, und zwar handelte es sich dabei entweder um caseinfreie Enzymlösungen (gelegentlich) oder um Verdauungslösungen, die nach mehrstündiger Verdauungsführung der Dialyse gegen die Grundsalzlösung unterworfen worden waren. Hier war der Befund konstant, wenn die Verdauungsdauer die zum Schwinden des säurefällbaren Caseins erforderliche Zeit überschritten hatte. Die Unmöglichkeit der Unterschichtung beruhte auf einem niedrigeren spezifischen Gewicht der betreffenden enzymhaltigen Lösungen gegenüber der Grundsalzlösung. In einem vorläufigen Orientierungsversuch ergaben sich jeweils nach der einfachen, doppelten, fünffachen, zehnfachen Verdauungszeit, die zum Caseinschwund benötigt war, für 10 ccm Gewichtswerte von: 10 . 1148, 10 . 1105, 10 . 0956, 10 . 0981 gegenüber 10 . 1306 der reinen Phosphatlösung und 10 . 2100 der fällungsfrei gewordenen, nicht dialysierten Verdauungslösung.

Zunächst wurden die Diffusionsresultate der substratfreien Enzymlösung mit solcher von verschiedenem Caseingehalt verglichen. Einige Vorversuche mit nur drei- bis vierwöchiger Diffusionsdauer waren so angesetzt worden, daß die Enzymausgangslösung einmal mit der Phosphat-, einmal mit 4proz. Caseinlösung 1 : 4 verdünnt, letztere etwa die doppelte

Zeit des Caseinschwunds bei 37° belassen wurde. Nachdem dann alle Lösungen die Temperatur des Wasserbades (etwa 10°) angenommen hatten, wurden die Diffusionsgefäße gefüllt. In allen nachfolgenden Tabellen werden die 20-ccm-Schichten nach der Entnahme von unten nach oben mit I bis V gezählt, I ist also die Diffusionsmutterlösung. Bei den Analysenwerten der Schichten bedeutet jeweils die erste Zahl den Gesamt-, die zweite den Aminostickstoff im Kubikzentimeter; wenn nur eine Zahl angegeben ist, bezeichnet sie den Aminostickstoff. Die Verdauungsversuche

Tabelle I.

2 Wochen Diffusion. Lösung 1 caseinfrei, Lösung 2 + 4 Proz. Casein.

	Analysenwerte				Verdauungsversuch					
					I		II		III	
	I	II	III		1	2	1	2	1	2
Lösung 1	96	46	36	4 Std. .	0	4	0	0	0	0
	7	4	1	24 „ .	1	8	0	1	0	0
„ 2	364	72	40	48 „ .	16	24	10	23	0	0
	139	40	2							

Die Zahlen zu den Querspalten des Verdauungsversuchs bedeuten Stunden.

Tabelle II.

4 Wochen Diffusion. Lösungen wie unter I.

	Analysenwerte				Verdauungsversuch					
					I		II		III	
	I	II	III		1	2	1	2	1	2
Lösung 1	52	48	36	4 Std. .	19	25	11	9	5	3
	16	6	3	24 „ .	30	52	22	31	9	5
„ 2	336	156	56	48 „ .	50	67				
	116	50	2							

Tabelle III.

8 Wochen Diffusion. Lösungen 1, 2, 3, 4 : 6, 4, 2, 0 Proz. Casein. Verdauung bis zum Caseinschwund in bzw. 6, $4^1/_2$ und 2 Stunden.

Analysenwerte.

	I	II	III	IV	V
Lösung 1	318	280	136	72	50
	99	85	46	16	8
„ 2	238	174	96	58	48
	74	53	28	10	7
„ 3	134	106	78	58	54
	44	30	19	7	6
„ 4	80	76	56	38	32
	12	12	6	4	0

Verdauungsversuch.

	I				II				III				IV				V			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
8 Std.	25	27	32	26	19	20	23	23	8	2	5	9	1	0	5	4	0	0	3	0
24 „	32	36	46	36	27	27	32	26	10	7	9	11	3	2	8	5	0	3	5	0
48 „	34	38	48	40	29	32	45	36	14	20	18	21	6	6	11	10	4	6	7	3

sind angesetzt mit 5 ccm der Schichtlösung auf 15 ccm 4proz. Caseins, die Entnahmen wurden zu gleichen Teilen mit n/10 HCl versetzt und in je 1 ccm dieser Lösung der Aminostickstoff nach *van Slyke* bestimmt, in den Tabellen ist der freigesetzte Aminostickstoff wie der Kjeldahlstickstoff in Hundertstel Milligramm angegeben.

Bei Betrachtung dieser Werte, die durch einen parallelen Versuch bestätigt wurden, sind am auffälligsten die gegenüber der substratfreien Enzymlösung erhöhten Verdauungswerte der 2proz. caseinhaltigen Lösung. Setzt man — ohne damit der Erklärung vorzugreifen — den gesamten Enzymgehalt der Diffusionsröhren der Gesamtproteolyse aller fünf Schichten proportional, so ergeben sich, je nach Verdauungszeit, diese Zahlen:

8 Stunden				24 Stunden				48 Stunden			
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
53	49	68	62	72	75	100	78	87	102	129	110

Diese Vergleichsreihe zeigt folgendes: Der relative Vorsprung von Lösung 3 gegenüber 1 nimmt zu, prozentisch errechnet von 22 über 28 auf 32,5, der gegenüber 2 nimmt ab von 28 über 25 auf 21, der gegen 4 nimmt erst zu von 7 auf 22, dann ab auf 15. Eine Erklärung, die erst auf Grund weiterer Befunde möglich werden wird, hat wohl in der Richtung des Resultierens von Hemmungswirkungen und Verteilung auf die Enzymkomponenten zu gehen.

Von Interesse ist es weiterhin, die prozentische Verteilung des gesamten Enzymgehalts auf die Diffusionsschichten — wieder unter der vorläufigen Voraussetzung der Proportionalität zum Proteolysen-

Tabelle IV.

	8 Stunden				24 Stunden				48 Stunden			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
I	47	55	47	43	45	48	46	46	39	37	37	36
II	36	41	34	37	39	36	32	33	33	31	35	33
III	15	4	7	13	14	9	9	14	16	20	14	19
IV	2	0	7	7	2	3	8	7	7	6	9	9
V	0	0	5	0	0	4	5	0	5	6	5	3

	Gesamtstickstoff				Aminostickstoff			
	1	2	3	4	1	2	3	4
I	37	39	32	29	39	43	42	35
II	33	29	25	27	33	31	28	35
III	16	16	20	20	18	16	18	18
IV	8	10	12	14	6	6	7	12
V	6	8	11	10	4	4	5	0

wert — unter den Lösungen und mit der Stickstoffverteilung anzustellen:

Die Tabelle IV lehrt, daß die prozentische Verteilung des Enzyms auf die Schichten mit zunehmender Verdauungsdauer immer gleichförmiger für alle vier Lösungen wird, und daß sie zugleich der Stickstoff- zumal der der Aminostickstoffverteilung auf die Schichten ähnlicher wird. Ohne eine ins einzelne gehende Analyse schon zu versuchen, sei doch auf einige auffällige Beziehungen hingewiesen. Die Lösungen der mittleren Caseinkonzentrationen, 2 und 3, zeigen in Schicht III eine beträchtliche Zunahme des prozentischen Anteils mit der wachsenden Verdauungszeit, während 1 und 4 fast konstant sind, besonders auffällig ist der starke Abfall von II auf III in 2 und 3 nach 8 und 24 Stunden. Dabei hat 3 in IV und V bereits beträchtliche Wirkung. Man hat den Eindruck, daß in diesen Lösungen zwei Sorten von Enzym verschiedener Teilchengröße nebeneinander diffundieren, daß die absolute Konzentrationserhöhung in 3 gegenüber den anderen beide Sorten betrifft, aber die teilchengrößere zu einem höheren Anteil, und daß in 2 dieser noch mehr überwiegt.

Das zentrale Problem — im Zusammenhang der eingangs gegebenen Problemstellung — war das, ob die scheinbare Zunahme der Enzymkonzentration in der substrathaltigen Lösung gegenüber der substratfreien eine tatsächliche sei, ob also zugleich mit der Wirkung auf das Substrat wirklich enzymwirksame Teilchen neu entstünden. Eine Erklärung durch Fortfall von Hemmungen, wie sie *Willstätter* für die von ihm beobachtete scheinbare Zunahme bei Adsorptionsbehandlungen angibt, kommt hier nicht in Frage, da ja vielmehr hemmende Substanzen hinzukommen (*Northrop*). Wohl aber könnte es sich entweder um eine „Aktivierung" handeln oder auch um eine andere Verteilung auf die einzelnen Komponenten des Enzyms. Eine allgemeine Aktivierung ist schon nach den mitgeteilten Befunden unwahrscheinlich, die Diffusionskurven sprechen dagegen (3 und 4 sind zunächst besonders verschieden), eine andere Verteilung auf die Komponenten ist mit der Angleichung der Diffusionskurven gegen Ende der Proteolyse weniger gut vereinbar, würde zudem doch eine echte Konzentrationszunahme einzelner Komponenten, sei es aus den anderen oder aus dem Substrat,

bedeuten[1]). Hier werden die im Gange befindlichen vergleichenden Verdauungsversuche mit verschiedenen Substraten weiterführen. Die jetzt mitzuteilenden Versuchsreihen stellen Vergleiche zwischen Lösungen gleicher Enzym- und Substratkonzentration, aber verschiedener Verdauungszeiten dar.

Tabelle V.

8 Wochen Diffusion. Vier Röhren, unterschichtet je 20 ccm (5 ccm Enzym + 15 ccm 4proz. Casein), 1. $1^1/_2$, 2. 3, 3. 6, 4. 12 Stunden bei 37° verdaut, Caseinschwund nach 3 Stunden.

Analysenwerte.

	I	II	III	IV	V
Röhre 1	304 90	186 47	86 20	— 7	— 5
„ 2	304 96	186 54	86 22	34 7	28 4
„ 3	280 117	180 56	98 24	36 10	28 6
„ 4	282 101	182 65	100 33	40 8	30 5

Verdauungsversuche.

	I				II				III				IV				V			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
8 Std.	26	33	26	30	25	30	27	22	4	5	6	1	4	1	0	0	1	0	1	0
24 „	49	44	43	41	39	46	36	43	10	11	17	15	5	3	2	3	3	4	3	3
48 „	52	56	58	56	43	48	53	51	12	17	22	20	6	6	7	8	5	6	3	6

Gesamtproteolyse der Diffusionsröhren.

8 Stunden				24 Stunden				48 Stunden			
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
60	68	60	53	106	108	101	105	118	133	143	141

Zur Deutung dieser Versuchsreihe ist zu berücksichtigen, daß nach früheren Versuchen die reversibel hemmenden Stoffe (*Northrop*) nur die Proteolyse der ersten Phase verlangsamen, nicht aber die Ausbeute bei längerer Dauer vermindern, welche also — ceteris paribus — als Ausdruck der gesamten Enzymkonzentration angesehen werden kann. Dann ergibt sich, daß mit der Dauer der Verdauung (vor dem

[1]) Das Massenverhältnis des freigesetzten Aminostickstoffs zu dem Gesamtstickstoff läßt, zumal in den oberen Schichten, wesentlich nur die eigentliche Protease (Kinase-Trypsin) wirkend erscheinen (vgl. *Waldschmidt-Leitz*, Ber. 59, 3000ff.).



Diffusionsansatz) die Enzymkonzentration steigt, zunächst nur erkennbar an dem Vorsprung von 2 vor 1. Die länger vorbehandelten Lösungen bleiben zunächst zurück. Daß dieses Zurückbleiben aber auf der Wirkung der vermehrt gebildeten hemmenden Stoffe beruht, daß die wahre Enzymkonzentration auch in ihnen noch weiter angestiegen ist, zeigt ihr Vorauseilen gegenüber 2 und erst recht gegenüber 1 nach 48 Stunden Versuchsdauer.

Die prozentische Verteilung auf die Schichten ergibt:

Tabelle VI.

	8 Stunden				24 Stunden				48 Stunden			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
I	43	49	43	58	46	41	43	39	45	42	41	40
II	42	44	45	41	37	43	36	41	37	36	37	36
III	7	6	10	1	9	10	17	14	10	13	15	14
IV	7	1	0	0	5	3	2	3	5	5	5	6
V	1	0	2	0	3	3	2	3	3	4	2	4

	Gesamtstickstoff			Aminostickstoff			
	1 wie 2	3	4	1	2	3	4
I	48	45	44	53	53	55	48
II	29	29	29	28	29	26	30
III	14	16	16	12	12	11	16
IV	5	6	6	4	4	5	4
V	4	4	5	3	2	3	2

Aus der prozentischen Verteilung des Stickstoffs ist zu ersehen, daß die Diffusionsmethode geeignet erscheint, den Fortgang der Verdauung weiter zu analysieren. So hat der Gehalt an freien Aminogruppen von 3 zu 4 nicht zugenommen — 213 und 212 —, wohl aber hat sich die Verteilung im Sinne der Diffusionsrichtung geändert, ein Zeichen, daß doch ein Fortgang der Aufspaltung stattgefunden hat. Daß bei der Verdauung mit schwacher Enzymkonzentration Strecken des Stillstandes der Aminowerte auftreten, ist eine stets zu machende Beobachtung. Wenn sie bei der Titration der Carboxylgruppen nicht in gleicher Weise zu finden ist, so kann das ja auf das Freiwerden von Amino- bzw. Iminogruppen beruhen, die von der *van Slyke*-Methode nicht erfaßt werden. Umgekehrt hat von 2 auf 3 eine beträchtlichere Aminofreisetzung stattgefunden, die prozentische Verteilung hat sich aber entgegen der Diffusionsrichtung verschoben.

Die prozentische Verteilung der Enzymwirkungen zeigt wiederum die Angleichung unter den vier Verdauungssystemen bei protahierter Proteolyse, aber auch dann noch größere Verschiedenheit gegenüber

der Stickstoff- und Aminoverteilung. Zu konstatieren ist ferner eine Zunahme der Diffusibilität mit der Vorverdauungsdauer (48-Stunden-Reihe). Auffällig ist die scheinbare Paradoxie, daß in einigen Fällen Schicht II die größere Wirksamkeit hat als I. Dazu ist folgendes zu beachten: Das inverse Verhalten tritt in keinem Falle bei 48stündiger Verdauung auf, es hängt also mit den Hemmungen zusammen, vielleicht auch mit einer durch die Diffusion geänderten relativen Komponentenzusammensetzung des Enzyms. Vielleicht kann da die Beobachtung weiterführen, daß da, wo nach 8 Stunden der Abfall von I zu II fast fehlt oder invertiert ist, er nach 24 Stunden relativ groß ist, und umgekehrt.

Tabelle VII.

8 Wochen Diffusion. Fünf Röhren, unterschichtet je 20 ccm (5 ccm Enzym + 15 ccm 4proz. Casein), 1. 1, 2. 2, 3. 4 Stunden bei 37° verdaut, Caseinschwund nach 2 Stunden. 1a. wie 1, 2a. wie 2, nur mit dem Unterschied, daß die Lösungen nach Schluß ihrer Verdauungszeit 24 Stunden gegen mehrfach gewechselte Phosphatlösung dialysiert hatten.

Aminowerte.

	I	II	III	IV	V
Röhre 1 . .	89	65	22	7	7
„ 2 . .	82	64	35	7	7
„ 3 . .	89	68	25	7	5
„ 1a .	18	17	8	3	3
„ 2a .	23	20	9	3	3

Verdauungsversuche.

	I			II			III			IV			V		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
8 Std.	20	31	34	17	14	17	3	2	5	0	0	0	0	0	0
24 „	48	53	57	38	36	48	7	15	15	1	3	1	0	0	0
48 „	52	63	65	40	44	57	14	27	20	5	4	3	0	0	0

	I		II		III		IV		V	
	1a	2a	1a	2a	1a	2a	1a	2a	1a	2a
8 Std.	17	22	18	11	2	6	0	0	0	0
24 „	39	41	37	30	20	16	6	3	0	2
48 „	48	50	48	40	25	24	10	6	2	4

Gesamtproteolyse der Röhren.

8 Stunden					24 Stunden					48 Stunden				
1	2	3	1a	2a	1	2	3	1a	2a	1	2	3	1a	2a
40	47	51	33	39	94	107	121	102	90	111	138	145	133	124

Der Versuch zeigt — hier von Anfang an[1]) — die überlegene Wirksamkeit der längere Zeit vorverdauten Lösungen, Varianten wie das relative Zurückbleiben von 2 in II mit nachfolgendem Vorauseilen in III deuten auf die Variabilität der enzymatischen Teilchen hin. Die Kombination mit der Dialyse verspricht weitere Aufschlüsse in dieser Richtung wie auch in der Erkenntnis der hemmenden Stoffe, entsprechende Versuche sind im Gange, auf die Diskussion sei daher noch verzichtet.

Da bei dem Vergleich verschiedener Caseinkonzentrationen sich die niedrigeren und bei dem der Vorverdauungsdauern sich die längeren als förderlicher für die Enzymwirksamkeit erwiesen hatten (Versuche mit höherer Konzentration und noch größerer Dauer sind im Gange), so wurde ein Versuch mit geringer Caseinkonzentration und verschiedenen Dauern angesetzt, eine Anordnung, die sich in der Tat als besonders günstig zur Untersuchungsfortführung erwies.

Tabelle VIII.

8 Wochen Diffusion. Vier Röhren, unterschichtet 20 ccm (5 ccm Enzym + 15 ccm 1 proz. Casein), Caseinschwund 20 Minuten. 1. Caseinfreie Vergleichslösung 5 ccm Enzym + 15 ccm Phosphat), 2. $^1/_2$, 3. $1^1/_2$, 4. 24 Stunden vorverdaut bei 37°.

Verdauungsversuche.

	I				II				III				IV				V			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
8 Std.	40	40	46	47	33	41	34	36	9	7	21	15	2	2	1	6	0	0	0	0
24 „	51	50	61	55	43	50	41	47	23	13	30	21	2	3	1	10	0	0	0	6
48 „	61	57	70	70	52	54	59	53	28	30	37	32	7	4	9	22	5	4	0	12

Gesamtproteolyse der Röhren.

8 Stunden				24 Stunden				48 Stunden			
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
84	90	102	104	119	116	133	139	153	149	177	189

Tabelle IX. Prozentische Verteilung auf die Schichten.

	8 Stunden				24 Stunden				48 Stunden			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
I	48	45	45	45	43	43	46	40	40	38	40	37
II	40	45	33	35	36	43	31	34	34	36	33	27
III	10	8	21	14	19	11	22	15	18	20	22	17
IV	2	2	1	6	2	3	1	7	5	3	5	13
V	0	0	0	0	0	0	0	4	3	3	0	6

[1]) Im Vergleich zu dem voraufgehenden Versuch sind die Vorverdauungszeiten kürzer.

Die Deutung der Versuchsergebnisse erscheint leichter als im Falle höherer Substratkonzentration, die Einwirkung der hemmenden Stoffe macht sich offenbar weniger bemerkbar. Zunächst wäre die Frage zu erörtern, ob die scheinbare Konzentrationszunahme des Enzyms lediglich ein Substratschutz des in der substratfreien Lösung mit der Zeit an Wirksamkeit verlierenden Enzyms sei. Abgesehen davon, daß die substratfreie Lösung nie auf einer höheren Temperatur als 10° sich befand, bei welcher Temperatur sie sich — ohne Diffusion — kaum verändert, so würde mit diesen Versuchsergebnissen der ziemlich undefinierte Begriff des Substratschutzes einen verständlichen Inhalt bekommen. Das Gleichbleiben (geringe Abnehmen) von 1 auf 2 bezeugt zudem, daß es sich nicht um eine einfache, rein zuständliche Konservierung des Enzyms durch das Substrat handeln kann. Andererseits kann aber auch das Ausgangsenzym in der Diffusionsanordnung nicht unverändert geblieben sein, denn der Vorsprung an Enzymkonzentration, den die länger vorverdauten Lösungen zunächst haben könnten, müßte von den anderen während des Verdauungsversuchs *nach* der Diffusion eingeholt werden, da sie ja die gleiche Ausgangszusammensetzung haben. Außerdem gewinnt man aus den Versuchen mit den höheren Caseinkonzentrationen den Eindruck, daß die scheinbare Enzymanreicherung keineswegs mit der Substratkonzentration, ihr proportional zunimmt, wenn auch die Verhältnisse dort durch die Hemmstoffe kompliziert werden.

Lassen sich nun — abgesehen von der scheinbaren Konzentrationszunahme — noch weitere Anzeichen finden, welche die Annahme stützen, daß die enzymatische Wirksamkeit ihren substanziellen Träger im Laufe der Wirkungsübung ändert? Ich meine, daß gerade der letzte Versuch solche Anzeichen bietet. Die Tabelle der prozentischen Verteilung zeigt, daß die Diffusibilität des Enzyms von 1 auf 2 abnimmt, von 2 auf 3 wieder ansteigt und in 4 sogar über die der Ausgangsenzymlösung beträchtlich hinauswächst. Wenn der Gang von 1 auf 2 mit der Annahme einer Enzymsubstratbindung verständlich erscheint, so der von 2 auf 3 schon kaum mehr, und der von 3 auf 4 nötigt zu der Annahme eines gegenüber dem Ausgangsenzym verkleinerten Wirkungsträgers. Zugleich aber mit diesem Gang auf 3 und 4 nimmt die scheinbare Enzymkonzentration zu.

Wenn aber die substratfreie Ausgangsenzymlösung diese Fähigkeit, in Gegenwart des Substrats unter Änderung der Teilchengröße sich anzureichern, verloren hat, während der Dauer der Diffusion, so muß diese Fähigkeit an einen vorübergehenden Zustand des Enzyms geknüpft sein. Andererseits steigt die scheinbare Enzymkonzentration mit der Dauer der Vorverdauung zunächst noch an, wofür die nächstliegende Erklärung — unter Vermeidung der Annahme einer echten

Vervielfachung des Enzyms — die wäre, daß die gesamte Wirkfähigkeit des Enzyms der Ausgangslösung sich erst innerhalb eines Zeitablaufs aktualisiert. Hier wird das Diffusionsexperiment die Entscheidung bringen können. Wenn die geschilderte Anschauung richtig ist, so muß es für jede Enzymkonzentration eine optimale Substratkonzentration und Vorverdauungsdauer bezüglich der Diffusionsausbeute geben, und diese Daten müssen sich für relative Enzymkonzentrationen in bestimmter Reihe ordnen.

Die aus den Versuchen gefolgerte Annahme einer zeitlichen Aktivierung des Enzyms zur „Anregung" im Sinne der Diffusionsausbeute, seiner fortgehenden Zustandsänderung also mit Ausgang in die irreversible Inaktivität, macht manche weitere Erscheinungen verständlich. So die Beobachtung, daß bei gleichzeitiger Gegenwart zweier Substrate (Casein und Gelatine) in Konzentrationen, die jede das Maximum der Proteolysierbarkeit für die bestimmte Enzymkonzentration und Zeit darstellen, die tatsächliche Proteolyse die Summe beider Maxima ist. Wenn beiden Substraten verschiedene Stadien der Enzymzustandsänderung adäquat sind, so ist die Beobachtung nicht absonderlich, es sind ja zweifellos die verschiedenen Zustandsformen nebeneinander in der Lösung.

In einem Versuch wurde die Diffusion aus substrat- und enzymreicherer Lösung über 16 Wochen in Gang gelassen:

Tabelle X.

8proz. Casein, 40 ccm + 10 ccm Enzymlösung (etwa doppelt so wirksam wie in den anderen Ansätzen), davon 20 ccm unterschichtet.

Aminowerte.

I	II	III	IV	V
157	117	79	47	24

Verdauungsversuche.

	I	II	III	IV	V
8 Std. . .	42	38	8	3	1
24 „ . .	70	65	55	12	7
48 „ . .	77	75	63	22	8

Die Frage, wie sich andere Substrate verhalten, ist in einigen Vorversuchen mit Gelatine angegangen worden. Die Vorverdauung der Gelatine durch die Enzymlösung wurde jeweils bis zur Konstanz der Durchflußgeschwindigkeit im *Ostwald*schen Viskosimeter durchgeführt, die Verdauungsversuche nach der Diffusion mit Casein wie in den voranstehenden Versuchen angesetzt.

Tabelle XI.

4 Wochen Diffusion. Je 20 ccm unterschichtet, 1. gelatinefrei, 2. 4 Proz. Gelatine, gleiche Enzymkonzentration.

Stickstoffwerte.

I		II		III	
1	2	1	2	1	2
86	454	48	136	36	48

Verdauungsversuche.

	I		II		III	
	1	2	1	2	1	2
4 Std. . . .	16	24	10	11	0	1
24 „ . . .	32	40	24	19	4	2
48 „ . . .	43	47	31	27	6	6

In diesem Versuch sind also die Gesamtproteolysen beider Ansätze gleich, in den bisherigen Versuchen mit längerer Diffusionsdauer und verschiedenen Substratkonzentrationen ergaben sich Differenzen in der 48-Stunden-Ausbeute zugunsten der gelatinereicheren, in den Anfangswerten im gegenteiligen Sinne.

Anhang.

Nachstehend sei noch eine Versuchsreihe mitgeteilt, deren Methodik darauf abzielte, weiteren Aufschluß über die Veränderung der Enzymwirkungsart durch Zustandsänderung während der Verdauung zu erlangen. Es wurde einmal der Aminostickstoff neben dem mit Gerbsäure nicht fallenden Gesamtstickstoff bestimmt, außerdem jeweils ein Quantum des Verdauungsgemisches im Überschuß von Pottasche verkohlt und die Methylenblauadsorption der Kohle kolorimetrisch gemessen[1]). Es wurden zwei parallele Versuchsreihen angesetzt, deren Enzymgehalte sich wie 1 : 10 verhielten, der Ausgangssubstratgehalt war 4 Proz. Casein. Nach 24stündiger Verdauung bei 37° wurde ein Quantum des Verdauungsgemisches gegen die mehrfach gewechselte Grundsalzlösung (Phosphatgemisch von p_H 7,5) 24 Stunden dialysiert, dann mit dem gleichen Volumen 4proz. Caseins nochmals 24 Stunden verdauen lassen, abermals dialysiert und mit 4proz. Casein zu gleichen Teilen und in einer anderen Portion mit 5proz. Gelatine ebenfalls 1 : 1 zur Verdauung angesetzt. Die Aminowerte entsprechen 1 ccm der Lösung, ebenso sind die Werte des nicht fällbaren Stickstoffs auf 1 ccm berechnet in Hundertstel Milligramm, gefällt wurde 1 ccm der Lösung mit 2 ccm des *Hedin*schen Gerbsäurereagens.

[1]) Siehe „Adsorptionskohle als Kolloiddiagnosticum", diese Zeitschr. **161**, 339, 1925.

A. Höherer Enzymgehalt.

	Anfangsverdauung			Endverdauung Casein			Endverdauung Gelatine		
	NH_2	N_2	Ads.	NH_2	N_2	Ads.	NH_2	N_2	Ads.
20 Min. . .	40	0	20	6	0	19	1	0	20
1 Std. . . .	72	0	25	11	4	20	3	0	20
3 „ . . .	—	—	—	18	6	15	5	0	19
6 „ . . .	85	127	24	30	31	—	7	10	—
24 „ . . .	131	240	21	46	96	13	22	6	14

B. Niedrigerer Enzymgehalt.

	Anfangsverdauung			Endverdauung Casein			Endverdauung Gelatine		
	NH_2	N_2	Ads.	NH_2	N_2	Ads.	NH_2	N_2	Ads.
20 Min. . .	34	0	21	0	14	19	1	0	17
1 Std . . .	36	0	22	0	24	15	1	0	15
3 „ . . .	—	—	—	1	40	14	1	4	15
6 „ . . .	52	0	20	4	60	—	1	9	—
24 „ . . .	79	180	23	18	64	14	2	34	15

Die beiden Versuchsreihen zeigen in gleicher Weise einen Unterschied im Verdauungsgang der Ausgangs- und der Endlösungen. Während in den ersteren die Aminowerte bis zu etwa dem gleichen Betrage in beiden Versuchen ansteigen, ehe der unfällbare Stickstoff — dann aber beträchtlich — zunimmt, ist in den Endverdauungen ein gleichmäßigeres Ansteigen der Stickstoffwerte festzustellen, und zwar relativ zu den Aminowerten um so mehr, je geringer deren Zunahme im ganzen bleibt. Auch die Adsorptionswerte der Kohlen zeigen in den Anfangs- und Endversuchen verschiedenen Gang, in den ersteren eher zunehmend, in den letzteren deutlich abnehmend.

Diese Versuche können natürlich nur die Wahrscheinlichkeit einer Wandlung in dem Enzymcharakter aufzeigen, zu einer Analyse reichen sie nicht hin.

Zusammenfassung.

Die Methode der freien Diffusion aus tryptischen Verdauungsgemischen ist geeignet, um Aufschlüsse über den Gang der Proteolyse und die Änderungen in Wirksamkeit und Zustand des Enzyms zu erhalten.

Dabei ergab sich, daß in einer Trypsin-Caseinlösung mäßiger Konzentrationen (1 bis 2 Proz. Casein) eine scheinbare Konzentrationszunahme des Enzyms eintritt, die mit der Dauer der Vorverdauung zunächst wächst. Mit der Vorverdauungszeit nimmt dabei die Diffusibilität des Enzyms anfangs ab, dann zu, und zwar bis über die der Ausgangsenzymlösung hinaus.

Auch in höheren Caseinkonzentrationen sind die gleichen Veränderungen festzustellen, nur im Gesamtausmaß beeinträchtigt durch die vermehrte Bildung hemmender Stoffe aus dem Substrat.

Die Annahme eines Zerfalls von Enzymaggregat zu kleineren wirksamen Teilchen gibt keine Erklärung der Beobachtungen, vielmehr muß angenommen werden, daß das Enzym an der Fähigkeit, in Berührung mit dem Substrat eine scheinbare Konzentrationszunahme bei gleichzeitiger Teilchenverkleinerung zu erfahren, mit der Zeit einbüßt. Bei kurzer Vorverdauungsdauer tritt zwar eine Enzymsubstratbindung zu größeren Teilchen ein, aber keine scheinbare Konzentrationszunahme. Es hat den Anschein, als ob die Fähigkeit des Enzyms, sich an Substrat zu binden und aus der Bindung weiterhin wirksame (aber kleinere) Teilchen wieder hervorgehen zu lassen, eine in Anfang und Ende zeitlich begrenzte Phase innerhalb der Gesamtlebensdauer des Enzyms sei.

Nach noch nicht abgeschlossenen Versuchen scheint es weiter so zu sein, daß die enzymwirksamen Teilchen bei noch länger fortgesetzter Verdauung wieder an Größe zunehmen.

Die flüchtigen Stoffe der Nahrungsmittel.

Von

J. König und **W. Schreiber.**

(Mitteilung aus der Landwirtschaftlichen Versuchsstation in Münster i. W.)

(Eingegangen am 15. Februar 1927.)

Die von den verschiedensten Seiten beobachtete Erscheinung, daß vitaminhaltige Nahrungsmittel durch Aufbewahren, Trocknen, Erhitzen und Kochen in ihrer Wirkung als Schutzmittel gegen die Mangelkrankheiten (Avitaminosen) eine Einbuße erleiden, legt die Frage nahe, ob diese Nahrungsmittel etwa flüchtige organische Stoffe enthalten und welcher Art diese sind. Nach einigen unterrichtenden Vorversuchen mit *Fr. Bartschat*[1]) konnten durch Erhitzen unter Durchleiten von Luft oder Kohlensäure in verschiedenen Nahrungsmitteln in der Tat deutliche Mengen flüchtiger, *reduzierender*, organischer Stoffe nachgewiesen werden. Ich habe dann diese Versuche gemeinschaftlich mit *W. Schreiber* in umfassenderer Weise fortgesetzt, und mögen die bisherigen Ergebnisse auch hier kurz mitgeteilt werden.

I. Ausführung des Verfahrens.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß die Nahrungsmittel im natürlichen — nötigenfalls im zerkleinerten — Zustande oder nach vorherigem Trocknen oder Kochen in einem geräumigen, 3 Liter fassenden Rundkolben im Paraffinbad auf 98 bis 100° erhitzt und die entwickelten Gase mittels eines Stickstoffstroms unter vorherigem Kühlen durch eine ammoniakalische Silberlösung — 24 proz. Ammoniak und Silberoxyd (Ag_2O *E. Merck*) — geleitet wurden. Wir wählten Stickstoffgas zum Durchleiten, weil dieses von den üblichen zu diesem Zwecke angewendeten Gasen am indifferentesten ist und daher etwaige Umsetzungen bei längerem Durchleiten am sichersten ausschließt. Das Stickstoffgas wurde behufs Reinigung zuerst durch eine mit Manganchlorür versetzte

---

[1]) Vgl. *J. König*, Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußm. 50. 12, 1925; desgleichen *J. König* und *W. Schreiber*, ebendaselbst 53, 1. 1927.

alkalische Flüssigkeit[1]), darauf durch ammoniakalische Silberlösung — dieselbe, welche zur Absorption der flüchtigen Stoffe diente — und zuletzt durch eine Bimssteinschicht geleitet, die mit verdünnter Schwefelsäure getränkt war. Der Destillationskolben stand 5 cm über dem Boden des Paraffinbades, um ein Anbrennen der zu erhitzenden Stoffe zu verhüten. Das Gaszuleitungsrohr reichte bis nahezu auf den Boden des Destillationskolbens, das austretende Gas ging durch ein nahe unter einem Gummipfropfen mündendes Ableitungsrohr zunächst durch einen vorgelegten *Liebig*schen Kühler und weiter durch ein System von vier mit mehreren Kugeln versehenen *Peligot*schen Röhren, die mit der ammoniakalischen Silberoxydlösung gefüllt waren. Die zwei ersten *Peligot*schen Röhren blieben unerwärmt, die dritte wurde in einem Wasserbad auf 45 bis 50° erwärmt, während das vierte Rohr als Kontrollrohr diente. Letzteres zeigte bei allen Versuchen entweder keine oder nur mehr eine schwache Reduktion der Silberlösung.

Durch die ammoniakalische Silberlösung wurden gebunden: *Kohlensäure*, *Schwefelwasserstoff*, *Mercaptan*, *Phosphor* bzw. *Phosphorverbindungen* bzw. oxydiert: verschiedene flüchtige *Aldehyde* (Form-, Acetaldehyd und andere), sowie sonstige flüchtige, reduzierende organische Stoffe. Die ersten drei durch Erhitzen der natürlichen oder der durch Alkali zersetzten Nahrungsmittel auftretenden flüchtigen Stoffe sind bereits von *F. Niemann*[2]) und *M. Rubner*[3]) nachgewiesen, der Nachweis der sonstigen beim Erhitzen der *natürlichen* Nahrungsmittel auftretenden flüchtigen Stoffe auf Kochtemperatur dürfte unseres Wissens neu sein. Zur Trennung und quantitativen Bestimmung der flüchtigen Stoffe verfuhren wir in folgender Weise:

Die Vorlagen, von denen bei der Destillation vitaminhaltiger Nahrungsmittel die erste, kalt gehaltene, mitunter, die dritte, erwärmte, neben ausgeschiedenem schwarzen oder braunen Niederschlag meistens einen Silberspiegel zeigte, wurden zunächst im Wasserbad auf 50° erwärmt, wobei der vorhandene Niederschlag wie Silberspiegel in der Regel noch vermehrt wurden, dann erkalten gelassen. Nach längerem Stehen wurde der Inhalt aller vier Vorlagen durch ein Asbestfilter in einen Goochtiegel filtriert und das Filter mit ausgekochtem Wasser ausgewaschen. Der nach dem Nachspülen mit Ammoniak an den Wandungen haftende Silberspiegel wurde durch Salpetersäure (1,2) gelöst und die Lösung für sich aufbewahrt, um später mit der Silberlösung aus dem Silberniederschlag nach Aufarbeitung desselben vereinigt zu werden. Diese Aufarbeitung, sowie die des ammoniakalischen Filtrats, welches die Kohlensäure und die Oxydationserzeugnisse der flüchtigen organischen Stoffe enthielt, geschah in folgender Weise:

a) Der *Silberniederschlag*, der außer metallischem (reduziertem) Silber noch Silbermercaptid, Silbersulfid und eventuell Phosphorsilber enthalten konnte, wurde behufs Trennung und Bestimmung der genannten Bestand-

---

[1]) Bei Anwendung eines Luftstromes wurde nur Kalilauge als Waschflüssigkeit angewendet.

[2]) Arch. f. Hygiene 19, 126, 1893.

[3]) Ebendaselbst 19, 136, 1893.



teile in einen 300-ccm-Kolben übergeführt; der Kolben wurde durch einen Pfropfen mit zwei Öffnungen verschlossen, durch dessen eine Öffnung ein mit Glashahn versehener Einfülltrichter bis auf den Boden des Kolbens, durch dessen andere Öffnung ein dicht unter dem Pfropfen mündendes Ableitungsrohr zu einer *Peligot*-Vorlage führte, die mit kalihydrathaltigem 10proz. Wasserstoffsuperoxyd gefüllt war. Durch das Trichterrohr wurde zunächst 5proz. Salzsäure zugefügt, um nach dem Vorschlage von *F. Niemann* und *M. Rubner* das *Silbermercaptid* zu zerlegen; nachdem dieses ausgetrieben und die Vorlage durch eine neue ersetzt war, wurde konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1,19) zugegeben, um auch das *Silbersulfid* zu zerlegen. Der Inhalt der beiden Vorlagen wurde jeder für sich im Wasserbad zur Trockne verdampft, mit salzsäurehaltigem Wasser aufgenommen und in der Lösung die gebildete Schwefelsäure mittels Chlorbarium gefällt. Der aus dem Bariumsulfat der ersten Fällung berechnete Schwefel wurde als Mercaptid-Schwefel, der aus dem Bariumsulfat der zweiten Fällung berechnete als Schwefelwasserstoff-Schwefel angesehen[1]). Der Destillationsrückstand, der das gebildete Silberchlorid und das metallische (reduzierte) Silber sowie etwaiges Phosphorsilber enthielt, wurde nach dem Verdünnen mit Wasser filtriert, der Filterrückstand mit Ammoniak und hierauf mit Salpetersäure behandelt. In der ammoniakalischen Lösung wurde das Silberchlorid durch Salzsäure, in der salpetersauren Lösung — ebenso in der anfangs von dem Silberspiegel hergestellten Lösung — das Silber mittels Salzsäure gefällt; alle Fällungen von Chlorsilber wurden durch dasselbe Filter filtriert, und aus dem gewogenen Chlorsilber wurde die *Gesamtmenge* des durch Schwefel- (und etwaige Phosphor-) Verbindungen und sonstige flüchtige organische Stoffe gebildeten *reduzierten Silbers* berechnet.

Das Filtrat vom gesamten Chlorsilber und die salzsauren Filtrate von den Bariumsulfatfällungen, welche die etwa aus *Phosphorverbindungen* gebildete *Phosphorsäure* enthalten konnten, ferner die bei der Bestimmung der Kohlensäure aus dem Barytniederschlag[2]) gewonnene salzsaure Lösung wurden vereinigt und zur Trockne verdampft; der Trockenrückstand wurde mehrmals mit Salpetersäure eingedampft und schließlich die Phosphorsäure in der salpetersauren Lösung nach dem Molybdänverfahren bestimmt.

b) Das *Filtrat* vom *Gesamtsilberniederschlag*, welches außer der entbundenen Kohlensäure auch die Oxydationserzeugnisse der flüchtigen organischen Stoffe enthielt, wurde mit überschüssiger 3proz. Barytlauge versetzt und unter Luftabschluß aufgekocht. Der aus Bariumcarbonat und etwaigem Bariumphosphat und Silberhydroxyd bzw. Silberoxyd bestehende Niederschlag wurde in gleicher Weise wie der Silberniederschlag in ein 300-ccm-Kölbchen übergeführt, und nach Zusatz von Salzsäure wurde in bekannter Weise die Kohlensäure durch Auffangen in Kalilauge bestimmt.

---

[1]) Diese Art der Trennung der Schwefelverbindungen ist ebenso einfach und sicher, wie die, das Mercaptan in Bleilösung aufzufangen und als Bleimercaptid zu wägen oder das rückständige, von Mercaptan befreite Silbersulfid mit konzentrierter Salpetersäure zu lösen und in dieser Lösung die Schwefelsäure zu bestimmen.

[2]) Der Bariumcarbonatniederschlag enthält auch die etwa während des Durchleitens von Stickstoffgas durch die oxydierende Wirkung des Silberoxyds aus Phosphorverbindungen entstandene Phosphorsäure als Bariumphosphat.



Das Filtrat vom Bariumcarbonatniederschlag wurde, um die etwa aus dem Ammoniak während der Destillation entstandene Salpetersäure in Ammoniak überzuführen, mit *Devarda*scher Legierung versetzt und im Wasserbad zur Trockne verdampft, wobei infolge des vorhandenen überschüssigen Bariumhydroxyds alles Ammoniak ausgetrieben wurde, während der Abdampfrückstand aus zuvor noch nicht ausgefälltem Silberoxyd, Bariumhydroxyd und den Bariumsalzen der aus den reduzierenden, flüchtigen Stoffen durch Oxydation entstandenen organischen Säuren bestand. Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, filtriert, im Filtrat das überschüssige Bariumhydroxyd durch Einleiten von Kohlensäure und durch Aufkochen gefällt und das Bariumcarbonat wiederum abfiltriert. Das eingedampfte Filtrat hatte häufig noch schwache alkalische Reaktion, diese wurde nach Zusatz von Phenolphthalein durch titrierte Schwefelsäure beseitigt und so nach Erwärmen und Filtration eine wässerige Lösung (L) erhalten, welche nur noch die aus den reduzierenden Stoffen entstandenen organischen Säuren als Bariumsalze enthielt.

Diese Lösung (L) wurde in ein kleines Kölbchen von 300 ccm Inhalt gegeben, mit Schwefelsäure versetzt und anfänglich[1]) nach Vorschaltung eines Kühlers destilliert; die übergehenden flüchtigen Säuren wurden in Sublimatlösung aufgefangen; das ausgeschiedene Kalomel wurde auf getrocknetem und gewogenem Filter gesammelt und getrocknet, wieder gewogen und auf *Ameisensäure* umgerechnet. Neben dieser konnten wir qualitativ auch vielfach *Essigsäure* und *Buttersäure* nachweisen[1]). Das bei der Destillation mit Schwefelsäure im Destillationskolben gebildete Gesamtbariumsulfat wurde abfiltriert und gewogen. Das hieraus berechnete Barium, vermindert um die der Ameisensäure und sonstigen flüchtigen Säuren (Essigsäure und andere) entsprechende Menge, ergab die Menge Barium, welche an sonstige, durch Oxydation der reduzierenden Stoffe entstandene, nicht flüchtige organische Säuren gebunden war. Durch Ausschütteln des letzten schwefelsauren Filtrats mit Äther hinterblieb nach dem Verdampfen des Äthers meist ein saurer Rückstand, der bei gewöhnlicher Temperatur fest war. Die Natur dieser Säuren muß noch ermittelt werden.

II. Ergebnisse der Untersuchung.

In der Regel wurde zum Auffangen der flüchtigen Stoffe beim Erhitzen auf 100° je 1 kg der Nahrungsmittel angewendet, bei wasserärmeren auch weniger. Bei wasserreichen bzw. an Trockensubstanz armen Nahrungsmitteln empfiehlt es sich, um genügend große Mengen flüchtiger Stoffe zu erhalten, tunlichst 2 kg in zwei Anteilen anzuwenden.

Die festen, sperrigen Nahrungsmittel wurden vorher entweder wie *Fleisch, Kartoffeln, Obst* zu kleineren Stückchen zerhackt oder wie *Gemüse*

---

[1]) In späteren Versuchen wurde die erste Destillation im *Wasserdampfstrom* vorgenommen, um auch die Essigsäure und sonstige mit Wasserdampf flüchtige Säuren überzutreiben; die gesamte Menge der flüchtigen Säuren wurde durch titrierte Barytlauge genau neutralisiert, die neutralisierte Lösung mit Schwefelsäure versetzt und wieder destilliert; durch Auffangen des Destillats in Sublimatlösung wurde dann die *Ameisensäure* bestimmt; so läßt sich auch die Menge der Essigsäure bzw. der sonstigen flüchtigen organischen Säuren berechnen.

fein zerschnitten, dann mit Wasser zu einer breiigen Masse verrührt und erhitzt. Aber auch so hält es schwer, die *ganze* Masse *bis ins Innere* auf gleichmäßige Temperatur von 100° zu erhitzen. Bei Anwendung von *Preßsaft* haben wir bis jetzt keine wesentlich besseren Ergebnisse erzielt. Bei *Eiern* wurde eine gleichmäßigere Verteilung dadurch erreicht, daß wir Eiklar wie Eigelb vorher mit einer genügenden Menge erbsengroßer Stückchen reinsten Bimssteins durchmischten.

Durch nur *zweistündiges Erhitzen auf 100°* erhält man noch *nicht die ganze Menge* flüchtiger Stoffe; durch längeres Erhitzen — besonders bei etwas höherer Temperatur — spalten sich immer flüchtige Stoffe ab. Wir haben uns aber hiermit einstweilen begnügt, um uns nicht zu weit von dem küchenmäßigen Kochen zu entfernen.

Wir erhielten auf diese Weise für die bis jetzt untersuchten Nahrungsmittel, auf *1 kg Trockensubstanz berechnet*[1]), die Ergebnisse der Tabelle I.

Die vorstehend in 1 kg Trockensubstanz gefundenen Mengen flüchtiger organischer Stoffe sind zwar so gering, daß sie als bedeutungslos für die Ernährung und zu gering für die quantitative Bestimmung erscheinen. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, daß, wie schon erwähnt, durch zweistündiges Erhitzen auf 100° *nicht alle* flüchtigen Stoffe ausgetrieben werden, durch weiteres zweistündiges Erhitzen, besonders bei etwas höherer Temperatur, werden noch wesentliche Mengen erhalten, wie wir das bei Milch, Fleisch und Blumenkohl festgestellt haben; daß aber auch schon geringe Mengen in der Nahrung wirksam sein können, beweist das Verhalten der geringen Mengen basischer Stoffe bei Fleisch und den alkaloidhaltigen Genußmitteln, ferner der ätherischen Aromastoffe bei den Gewürzen und ebenso auch das Verhalten der Vitamine, deren Gehalt in den Nahrungsmitteln so gering ist, daß man sie bis jetzt vergebens zu gewinnen versucht hat. Was die Zuverlässigkeit der quantitativen Bestimmung anbelangt, so verlaufen die Reaktionen im großen und ganzen mit freiem Auge erkennbar und lassen sich bei einiger Erfahrung schon äußerlich der Art und Menge[2]) nach beurteilen. Dazu werden die flüchtigen Stoffe zum Teil in Form von Verbindungen mit hohem Molekulargewicht gewogen, nämlich der Schwefel im Silbermercaptid und Silbersulfid nach Überführung in Schwefelsäure als Bariumsulfat mit dem mehr als siebenfachen Molekulargewicht des Schwefels, der Formaldehyd nach Überführung in Ameisensäure als Kalomel mit dem fast 15fachen Molekulargewicht der Ameisensäure, der Phosphor nach Überführung in Phosphorsäure als Magnesiumpyrophosphat mit dem 3,6fachen Molekulargewicht des Phosphors.

---

[1]) Wir führen hier nur die auf 1 kg Trockensubstanz berechneten Werte auf, weil bei der großen Verschiedenheit der Nahrungsmittel im Gehalt an Trockensubstanz nur diese Werte einen Vergleich bieten.

[2]) Schwefelwasserstoff und Mercaptan liefern flockige Niederschläge, die Aldehyde fein verteiltes, metallisches Silber und Silberspiegel.



Tabelle I.

Nahrungsmittel		In 1000 g Trockensubstanz: Kohlensäure *) CO_2 mg	Schwefelwasserstoff H_2S mg	Mercaptan $CH_3.HS$ mg	Formaldehyd H.CHO mg	Barium, gebunden durch die aus Aldehyden entstand. Säuren: Ameisensäure mg	Sonstige flüchtige Säuren **) mg	Nicht flüchtige Säuren mg	Angeblicher relativer Vitamingehalt ***): Wachstum: wasserlöslich B	fettlöslich A	Antirachitisches D	Antiskorbutisches C
1. *Milch* †)												
a) Frisch	1.	400,0	16,0	0	1,5	3,2	12,8	32,8	++	+++	schwankend	
	2.	413,6	16,0	0	1,0	2,4	7,2	25,6				
b) Gekocht		273,6	14,6	0	1,5	3,2	11,2	25,6	+	++	?	wenig
2. *Rindfleisch* †)												
a) Frisch, ungekocht		231,7	9,1	2,7	1,2	2,7	6,1	8,2	+	+	?	+
b) Kochrückstand		—	18,4	3,4	0,6	1,3	12,2	12,6	—	—	—	—
c) Fleischbrühe		—	3,4	3,4	2,7	6,0	10,2	13,9	—	—	—	—
3. *Butter*		12,7	Spur	0	1,4	3,2	95,7		Spur	+++	?	?
4. *Lebertran* †)		14,5	0	0	1,8	4,2	32,0		?	+++	+++	0
5. *Schweinefett*												
a) Flomen		—	1,5	Spur	0,8	1,8	26,6		—	—	—	—
b) Schmelzrückstand †)		—	1,5	Spur	0,6	1,3	11,1		—	—	—	—
c) Ausgeschmolzenes Fett		—	Spur	0	0,4	0,9	5,6		0	Spur	?	0
6. *Olivenöl*		Spur	0	0	0,4	0,9	3,6	1,3	0	Spur	?	0
7. *Cocosfett* (Palmin)		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0
8. *Eier*												
a) Eiklar		3009,4	198,8	Spur	wenig	wenig	160,5		Spur	Spur	?	Spur
b) Eigelb †)		87,3	12,4	0	5,3	12,2	133,4		+	+++	+++	?
9. *Bienenhonig*		Spur	0	0	0,4	0,9	7,0		0	0	0	0

*) Unterhalb 10 mg CO_2 liegende Werte in der frischen Substanz sind als innerhalb der Versuchsfehler liegend für die Berechnung auf Trockensubstanz nicht berücksichtigt.

**) Als Essigsäure berechnet.

***) Es bedeuten: +++ = sehr viel, ++ = guten, + = mäßigen, 0 = keinen Vitamingehalt, ? = fraglichen Gehalt, — = nicht ermittelt. Die Werte sind dem Werke von *Ragnar Berg*, Die Vitamine, 2. Aufl., S. 585 u. ff. Leipzig 1927 entnommen.

†) Folgende der bis jetzt hierauf untersuchten Nahrungsmittel lieferten bei zweistündigem Erhitzen auf 100° für je 1 kg Trockensubstanz *flüchtige Phosphor*verbindungen: 1. Milch (beim zweiten zweistündigen Erhitzen) 27,8 mg Phosphor bzw. 30,6 mg Phosphorwasserstoff. 2. Rindfleisch, mittelfett, deutlich nachweisbar. 4. Lebertran, deutlich nachweisbar. 5. Schmelzrückstand von Schweineflomen, schwach nachweisbar. 8. Eigelb, 12,2 mg Phosphor bzw. 13,2 mg

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Nahrungsmittel	In 1000 g Trockensubstanz: Kohlensäure CO_2 mg	Schwefelwasserstoff H_2S mg	Mercaptan $CH_3.HS$ mg	Formaldehyd H.CHO mg	Barium, gebunden durch die aus Aldehyden entstand. Säuren: Ameisensäure mg	Sonstige flüchtige Säuren mg	Nicht flüchtige Säuren mg	Angeblicher relativer Vitamingehalt: Wachstum wasserlöslich B	Wachstum fettlöslich A	Antirachitisches D	Antiskorbutisches C
10. Weizen-Mahlerzeugnisse											
a) Feinstes Mehl	—	Spur	Spur	Spur	Spur	29,3		Spur	Spur	?	?
b) Nachmehl	13,7	6,2	3,8	1,8	4,2	43,9		—	—	—	—
c) Keimmehl	242,3	8,0	3,8	2,3	5,3	63,9		+	+	?	Spur
d) Kleie	914,4	2,6	2,9	3,3	7,5	91,3		++	+	?	„
11. Kochreis (geschälter Reis)											
a) 1 kg = 1,28 Mk.	—	7,1	0	0	0	9,1		Spur	Spur	?	„
b) 1 kg = 0,68 „	—	7,8	0	Spur	Spur	4,6	1,5				
12. Reiskleie (Schälabfall) Reisfuttermehl a)	70,9	Spur	0	1,3	3,0	28,5		+	?	?	++
b)	64,0	„	0	1,0	2,3	14,9	10,4				
13. Kartoffeln [geschält] *) ungekocht	690,0	8,8	0	1,3	3,0	11,2	6,8	+++	+	?	++
14. Grüner Winterkohl											
a) frisch	10111,3	68,7	19,5	10,8	24,7	43,1	99,5	+++	+++	?	+++
b) Kochrückstand	235,9	12,8	9,7	5,6	12,8	nicht bestimmt		—	—	—	—
b) Kochwasser	—	33,3	13,3	7,7	19,0						
15. Blumenkohl											
a) frisch	3348,9	61,5	28,5	15,4	35,2	22,0	182,6	++	+	?	+
b) Kochrückstand	334,9	31,8	12,1	6,6	15,4	1,1	48,3	—	—	—	—
b) Kochwasser	433,7	53,8	17,6	8,8	19,8	7,7	64,8				
16. Spinat											
a) frisch	?	61,5	0	25,5	58,5	382,5		+++	+++	+++	+++
b) Kochrückstand	390,0	22,5	0	10,5	24,0	144,0		—	—	—	—
b) Kochwasser	—	51,4	0	19,5	45,0	175,5					
17. Apfelsinen	558,8	14,6	0	6,4	14,6	134,6		+++	wenig	?	+++
18. Zitronensaft	—	27,2	0	19,4	44,6	891,4		+	„	?	+++
19. Tomaten											
a) ganze Frucht	729,6	wenig	0	15,2	34,9	340,5		+++	+++	++	+++
b) Saft von 1 kg	360,2	„	0	16,7	38,0	442,3					

*) Siehe Fußnote †) von vorhergehender Seite.

III. Auswertung der Ergebnisse.

Immerhin können die vorstehenden, unter gleichen Bedingungen gewonnenen Werte als unter sich vergleichbar angesehen werden und gestatten vorbehaltlich einzelner Wiederholungen folgende Schlußfolgerungen:

1. *Kohlensäure.*

Die beim Erhitzen der Nahrungsmittel sich verflüchtigende Kohlensäure wird man allgemein als fertig gebildet, in den Zellen eingeschlossen ansehen. Das ist auch zweifellos zum Teil der Fall, Milch enthält z. B. neben 1,0 bis 2,5 ccm Sauerstoff und 7,5 bis 15,0 ccm Stickstoff 55,0 bis 75,0 ccm fertig gebildete Kohlensäure in 1 Liter eingeschlossen. Aber in den meisten Fällen sind die gefundenen Mengen Kohlensäure viel zu groß, als daß man sie auf diese Weise allein erklären könnte. So wurden durch Erhitzen aus je 1 kg Trockensubstanz folgende Mengen Kohlensäure (CO_2) verflüchtigt:

	Blumenkohl g	Spinat g	Salat g	Grünkohl g
Nach *F. Niemann*	2,736	2,275	5,613	nicht untersucht
„ hiesigen Untersuchungen	3,282 u. 3,349	nicht untersucht		10,111

Die große Menge flüchtiger Kohlensäure bei den grünen Gemüsen könnte zum Teil noch auf die Wirkung des Chlorophylls zurückgeführt werden, solange dieses durch die allmählich steigende Erhitzung von etwa 20° auf 100° noch nicht unwirksam geworden ist. Aber *F. Niemann* fand auch in 1 kg Spargel (Trockensubstanz), dessen Wachstum ohne direkte Mitwirkung von Chlorophyll verläuft, ebenfalls eine große Menge flüchtiger Kohlensäure, nämlich 8,804 g.

Weiter steht die Menge der flüchtigen Kohlensäure in vielen Fällen im geraden Verhältnis zu derjenigen der abgespaltenen Aldehyde. Dieses ist z. B. bei den *Mahlerzeugnissen des Weizens* (Nr. 10 der Tabelle) der Fall, wo Kohlensäure und Aldehyde von feinstem Weizenmehl bis zur gröbsten Kleie gleichmäßig zunehmen. Vgl. auch *Reis* (Nr. 11 und 12 der Tabelle); geschälter Reis ohne Aldehyde liefert auch keine Kohlensäure; in dem Schälabfall finden sich beide. Die frischen, grünen *Gemüse* liefern neben großen Mengen flüchtiger Kohlensäure auch entsprechend viel flüchtige Aldehyde. Selbst der *Kochrückstand* der *Gemüse* weist noch Kohlensäure und Aldehyde in entsprechendem Verhältnis auf, obschon erwartet werden könnte, daß durch das Kochen alle mechanisch eingeschlossene Kohlensäure ausgetrieben werden müßte. Bei den Früchten (Apfelsinen und Tomaten) treten ebenfalls Beziehungen zwischen der flüchtigen Kohlensäure und den abspalt-

baren Aldehyden auf, nämlich für je 1 kg Trockensubstanz von Gemüsekochrückständen und Früchten:

Gegenstand der Untersuchung		Kohlensäure mg	Formaldehyd mg	Barium, gebunden an Ameisensäure mg	Barium, gebunden an Säuren aus sonstigen Aldehyden mg
Kochrückstand von Gemüse	Grünkohl	235,9	5,6	12,8	nicht bestimmt
	Blumenkohl	334,9	6,6	15,4	49,4
	Spinat	390,0	10,5	24,0	144,0
Apfelsinen		558,8	6,4	14,6	134,6
Tomaten		729,6	15,2	34,9	340,5

Die Bildung von Kohlensäure neben der Abspaltung von Aldehyden kann wohl zwanglos auf vorhandene Ketone oder Ketonsäuren zurückgeführt werden.

So liefert bekanntlich β-Ketobuttersäure $CH_3 . CO . CH_2 . COOH$, durch einfaches Erwärmen CO_2 und $CH_3 . CO . CH_3$ (Aceton) und letzteres durch Oxydation $CH_3 . CO . CH_3 + 4 O = CH_3 . COOH + CO_2 + H_2O$.

2. *Schwefelwasserstoff.*

Alle Nahrungsmittel, welche Albumine enthalten, selbst die proteinarmen Früchte, spalten beim Erhitzen auf 100° Schwefelwasserstoff ab. Beim Erhitzen des *Eiklars*, das fast ausschließlich aus Albumin besteht, tritt neben viel Schwefelwasserstoff (198,8 mg) auch viel Kohlensäure (3009,4 mg für 1 kg Trockensubstanz) auf, während der geschälte Reis (Kochreis) beim Erhitzen wohl Schwefelwasserstoff, aber keine Kohlensäure liefert. Da beide, Eiklar wie Kochreis, nur wenig Aldehyde abspalten, so kann die erhöhte Menge Kohlensäure bei Eiklar wohl nur von dem im Eieralbumin (einem Glykoprotein) eingeschlossenen Kohlenhydrat herrühren.

Eine Beziehung zwischen dem Vitamingehalt und der Schwefelwasserstoffabspaltung der Nahrungsmittel scheint nicht zu bestehen; wenn durch Erhitzen letzterer der Nährwert vermindert wird, so muß das bei den Eiern wohl weniger auf den infolge Lockerung des Albumins auftretenden Verlust von Schwefelwasserstoff, der gegenüber der vorhandenen absoluten Menge nur gering ist, als vielmehr darauf zurückgeführt werden, daß ihre physikalische Beschaffenheit geändert wird, insonderheit darauf, daß die kolloiden Stoffe aus dem *Sol-* in den *Gel*zustand übergehen.

3. *Mercaptan.*

Durch Aufschließen pflanzlicher und tierischer Proteine mit Alkali sowie durch Erhitzen auf hohe Temperatur spalten diese, wie *M. Rubner*

nachgewiesen hat, vielfach Mercaptane, meistens *Methylmercaptan*, ab, ein Zeichen, daß sie letzteres vorgebildet enthalten; beim Erhitzen auf Kochtemperatur ist dagegen die Mercaptanabspaltung vorwiegend auf die *Kohlgemüsearten* beschränkt; wir fanden bis jetzt ferner Mercaptane in geringeren Mengen auch in Fleisch, Eiklar und Weizenkleie.

Das sind allerdings sämtlich Nahrungs- bzw. Futtermittel, die als vitaminreich bezeichnet werden. Aber andere als vitaminreich bezeichnete Gemüsearten, wie Möhren, Spinat und andere, besonders auch die vitaminreichen Obstfrüchte, spalten bei Kochhitze kein Mercaptan ab, so daß bei diesen eine vitaminöse Mitwirkung desselben ausgeschlossen zu sein scheint. Nach unseren bisherigen Untersuchungen liefern alle Nahrungsmittel, welche bei Kochhitze Mercaptan abspalten, unter den flüchtigen Stoffen auch Schwefelwasserstoff, aber nicht umgekehrt.

4. Phosphor bzw. Phosphorverbindungen.

Von großer Bedeutung für die Ernährung dürfte dagegen die Abspaltung von Phosphor- bzw. Phosphorverbindungen beim Erhitzen einiger Nahrungsmittel sein.

Den flüchtigen Phosphor bzw. Phosphorverbindungen fanden wir zuerst beim Erhitzen des *Eigelbs* auf 98 bis 102° (S. 110), dann desgleichen bei der *Milch* auf 102 bis 103° (Kochtemperatur der Milch); auch beim Erhitzen von *Fleisch*, *Lebertran* und *Grünkohl* auf 100° konnten wir unter den flüchtigen Stoffen deutlich Phosphor bzw. Phosphorverbindungen nachweisen. Beim Lebertran kann letzterer wohl nur von dem vorhandenen Lecithin herrühren, bei Milch aber gleichzeitig mit vom Casein, bei Eigelb desgleichen vom Vitellin. Jedenfalls kann man annehmen, daß alle Nahrungsmittel, welche Phosphatide, Lecithine oder phosphorhaltige Proteine enthalten, bei genügend langem und genügend hohem Erhitzen, sowie bei vorhandener Feuchtigkeit Phosphor abspalten werden.

a) Bemerkenswert aber ist es, daß die Nahrungsmittel: Milch, Eigelb, Lebertran, Butter, Fleisch und Grüngemüse, die beim Erhitzen mehr oder weniger flüchtige Phosphorverbindungen abspalten, auch als mehr oder weniger *wachstumsfördernd* bzw. als größere oder geringere *Schutz-* und *Heilmittel* gegen *Knochenerkrankungen* oder als mehr oder weniger reich an *Vitamin A* und *D*[1]) bezeichnet werden.

Auch ist es wohl verständlich, daß die aus den Phosphatiden im tierischen Stoffwechsel abgespaltenen Phosphorverbindungen im Ent-

[1]) Man unterscheidet neuerdings zwischen Wachstumsvitamin A und D; das Vitamin A (z. B. im Lebertran) soll sowohl Xerophthalmie (Augenerkrankungen) als Rachitis, Vitamin D (in Milch und Butter) wohl Xerophthalmie, aber keine Rachitis verhüten oder heilen können. Vgl. *W. Stepp*, Die Naturwissenschaften 14, 1124, 1926.



stehungszustande entweder als solche oder nach vorheriger Überführung in Phosphorsäure in erster Linie sich mit vorhandenem Kalk verbinden und das Wachstum — besonders das Knochenwachstum — unterstützen werden, und daß Milch, welche angeblich das Vitamin D enthält, besonders den Kalkansatz im Köıper fördern soll.

b) Gegenüber dieser durch den Gehalt gegebenen natürlichen Erklärung der Wirkungsweise muß es auffällig erscheinen, daß ähnlich wie Lebertran auch *ultraviolettes Licht antirachitisch* wirken soll, sei es, daß damit die rachitischkranken Tiere direkt oder die zu verabreichenden Nahrungsmittel bestrahlt werden. So können nach *Hess* und *Steenbock* Olivenöl und Baumwollsaatöl, nach *György* Milch und auch Trockenmilch durch halbstündige Bestrahlung mit der Quarzquecksilberlampe antirachitisch aktiviert werden. Der Stoff, an dem sich diese Aktivierung vollzieht, ist nach *Hess* das *Cholesterin*. Während unbestrahltes Cholesterin rachitisch gänzlich unwirksam ist, soll bestrahltes Cholesterin sich wie Lebertran verhalten. Das läßt sich wohl nur so erklären, daß das Cholesterin, welches nicht wie das Lecithin knochenbildende Stoffe (Stickstoff und Phosphorsäure) enthält, also direkt nichts zum Knochenwachstum beitragen kann, durch die Bestrahlung nach *Windaus* eine Umlagerung erfährt, z. B. aus der *Trans*- in die *Cis*verbindung übergeht und indirekt (katalytisch) wirkt, indem es Umsetzungen[1]) im tierischen Körper hervorruft oder befördert, wodurch die für den Aufbau der Organe und Knochen notwendigen Stoffe frei werden.

In letzter Zeit hat *A. Windaus*[2]) für die Wirkung des ultravioletten Lichtes auf Cholesterin eine andere Erklärung gegeben. Er nimmt in den Nahrungsmitteln eine *Vorstufe* des antirachitischen Vitamins, ein *Provitamin* an, das, an sich unwirksam, erst durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht wirksam (aktiviert) wird. Im *Lebertran* ist augenscheinlich von vornherein wirksames antirachitisches Vitamin vorhanden. Das *Ergosterin* der Hefe ist besonders reich an dem Provitamin. Dieses läßt sich aus dem Cholesterin durch fraktionierte Kristallisation oder Hochvakuumdestillation anreichern, so daß sich durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht Erzeugnisse gewinnen lassen, die noch in tausendstel Milligrammen antirachitisch wirken. Die Aktivierung des

---

[1]) *Takahashi* will aus Lebertran eine Verbindung $C_{22}H_{44}O_2$ (angeblich aus einem tertiären und primären oder sekundären Alkohol bestehend) gewonnen haben, welche in einer Menge von 1 mg in 1 kg Nahrung ein normales Wachstum — also auch das von Knochen — gewährleisten soll. Das ist aber schon deshalb sehr unwahrscheinlich, weil ein Körper von alkoholischer Natur auch nicht katalytisch wirken wird. — *J. C. Dümmond* (Chem. Centralbl. 1927, I, 1179) glaubt, daß es sich bei dem bestrahlten Cholesterin um einen höheren, *ungesättigten* Alkohol handelt.

[2]) Chem.-Ztg. 51, Nr. 12, 1927.

Provitamins besteht, wie *A. Windaus* jetzt annimmt, in einer *Iso- bzw. Polymerisation*, d. h. in einer Umlagerung desselben in ein *energiereicheres Isomeres*. Wenn auf diese Weise auch die stärkere Wirkung des bestrahlten Provitamins erklärt werden kann, so findet damit seine antirachitische Wirkung noch keine restlose Erklärung. Zwar erhöhen Tageslicht und Bewegung in freier Luft bei Alt und Jung den Stoffwechsel und sind auch für ein normales Wachstum in der Jugend besonders wichtig; aber eine ausgeprägte Rachitis tritt erst bei gleichzeitigem Mangel an Phosphor und Kalk oder an einem dieser Bestandteile in der Nahrung auf, und diese kann auch das bestrahlte Cholesterin nur durch katalytische Wirkung liefern.

Dafür, daß auch die *Sterine* bei der antiavitaminösen Wirkung der Fette und Öle eine Rolle mitspielen, spricht auch der Umstand, daß diese um so mehr Lecithin und Sterine (d. h. unverseifbare Stoffe) zu enthalten pflegen, je stärker antiavitaminös sie wirken. So ergaben die vorstehend auf flüchtige Stoffe bisher untersuchten Fette und Öle:

Fette bzw. Öle	In 100 g Fett					Flüchtige Stoffe in 1000 g		Verhalten gegen	
	Gesamt-Unverseifbares	Sterine		Sonstige unverseifbare Stoffe **)	*Lecithin*-Phosphorsäure [P_2O_5] ††)	Formaldehyd	Barium, gebunden durch Gesamtsäuren aus Aldehyden	Xerophthalmie	Rachitis
		gebundene *)	freie *)						
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg		
Lebertran (Dorsch)	540–7830	244	272	140	44,0	1,8	36,2	heilend	heilend
Butter	310– 510	0	75	80	14,4	1,3	93,3	„	nicht heilend
Schweineschmalz	100– 280	0	73–126	30	2,2	0,4	6,5	nicht heilend	nicht heilend
Olivenöl	[460–1400]†)	41,3	92,4	[550]†)	1,0	0,4	5,8	nicht heilend	nicht heilend
Cocosfett (Palmin)	150	17,3	62,5	60	1,3	0	0	nicht heilend	nicht heilend

*) Nach *Klostermann* und *Opitz*, Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel **27**, 713; **28**, 138. 1914.

**) Nach *Berg* und *Angerhausen*.

†) Das Unverseifbare bei *Olivenöl* besteht vorwiegend aus *Farbstoff*.

††) Nach eigenen Bestimmungen. Wir fanden an Unverseifbarem für 100 g Fett: Lebertran 701 mg, Butterfett 487 mg, Schweineschmalz 147 mg, Olivenöl 590 mg, Cocosfett (Palmin) 207 mg Das Unverseifbare von Olivenöl bestand auch bei dieser Probe vorwiegend aus Farbstoff.

c) *Flüchtigkeit von Phosphorverbindungen aus Futter- und Nahrungsmitteln.* Über die leichte Flüchtigkeit der Lecithin-Phosphorsäure liegen noch verschiedene sonstige Beobachtungen vor.

α) *Abnahme des Lecithingehalts beim Trocknen von Gras.* Veranlassung zu dieser Untersuchung gab die vielerorts gemachte Beob-

achtung, daß Jungvieh (Rinder und Ziegen), das mit Heu von sauren Moorwiesen oder Neuland gefüttert wird, an *Lecksucht*[1]) erkrankt, aber wieder genest, wenn es neben dem Heu Leinsamen erhält oder im Frühjahr auf die Wiesen, von denen das Heu stammt, getrieben wird und statt des Heues das junge Gras verzehrt.

Fr. Soxhlet und *Fr. Fleischmann*[2]) vermuteten, daß die Erkrankung durch Mangel an Lecithin im Heu hervorgerufen würde. *Fr. Fleischmann*[2]) ermittelte daher die Verluste an Lecithin beim Trocknen des Grases unter verschiedener Trocknungsweise und fand:

Art des Trocknens	Lecithin, löslich in 90 proz Alkohol Proz.	Lecithin, löslich in Äther Proz.	Ätherlösliches Lecithin in Proz. des alkohollöslichen Proz.
1. Im Vakuum 3 Std. bei 95° getrocknet	0,057	0,037	66
2. An der Sonne schnell (in 2 Tagen) getrocknet	0,048	0,030	61
3. Im Schatten langsam (in 3 1/2 Tagen) getrocknet	0,042	0,010	24

Wenn auch in dem Verlust an Lecithin bei der Heuwerbung damals nicht allein die Ursache der Lecksucht gesucht werden konnte, so ist doch wohl anzunehmen, daß der geringere Futterwert des Heues gegenüber dem jungen Grase, dessen direkter Verzehr bekanntlich einen hohen Vitamingehalt in der Milch zur Folge hat, durch die übliche Trocknung eine wesentliche Verminderung erfahren kann.

β) *Abnahme des Lecithins beim Trocknen der Gemüse. H. Vageler*[3]) fand in den Gemüsen große Mengen *Lecithinphosphor* und große Verluste beim Trocknen derselben und einiger sonstigen Pflanzenstoffe, d. h. bei der Überführung von dem frischen in den lufttrockenen Zustand (durch Trocknen bei 50 bis 60°), nämlich:

1. Gehalt an *Phosphor* in Form von Lecithin in der Trockensubstanz:

Salat	0,367 Proz.
Rhabarber	0,336 „
Schneidebohnen	0,250 „
Grüne Erbsen	0,147 „
Tomaten (grüne Früchte)	0,247 „

[1]) Unter *Lecksucht* versteht man die Krankheit der Tiere, daß sie zunächst alle Gegenstände belecken, Holzteile, Mörtel benagen, Holz, Stroh, Sand und anderes lieber als das betreffende Heu verzehren und schließlich eingehen. Häufig tritt in solchen Gegenden auch noch Knochenbrüchigkeit auf.

[2]) Landw. Versuchsstationen 76, 237, 1912.

[3]) Diese Zeitschr. 17, 189, 1909.

2. **Lecithinphosphor in frischen und getrockneten Pflanzenstoffen:**

	Haferkörner		Lupinensamen		Kopfsalat		Algen		Rhabarberblätter	
	Wasser Proz.	Phosphor Proz.	Wasser Proz.	Phosphor Proz.	Wasser Proz.	Phosphor Proz.	Wasser Proz.	Phosphor Proz.	Wasser Proz.	Phosphor Proz.
Frisch . .	14,94	0,0203	17,26	0,0496	94,93	0,1487	89,74	0,0376	90,16	0,2934
Getrocknet	11,66	0,0189	8,03	0,0398	10,37	0,0731	9,59	0,0353	7,22	0,0578
Abnahme .	3,28	0,0014	9,23	0,0098	84,56	0,0756	80,15	0,0023	82,94	0,2356
Abnahme in Proz. des ursprünglichen Phosphors.										
	—	6,9	—	19,7	—	50,8	—	6,1	—	80,3

Dem Phosphorgehalt würden 3,74 bis 9,36 Proz. Oleinpalmitinlecithin in der Trockensubstanz der grünen Gemüse entsprechen, also einem Lecithingehalt, der wie der Verlust hiervon beim Trocknen von Kopfsalat und Rhabarberblättern sehr hoch erscheint. Die Ergebnisse würden aber mit den Angaben im Schrifttum übereinstimmen, wonach gerade die grünen Gemüse sehr reich an den in Ölen löslichen Vitaminen A und D sein und diese beim Aufbewahren und Trocknen bald einbüßen sollen.

γ) *Abnahme des Lecithins beim Erwärmen der Milch.* Der Gehalt der *Kuhmilch* an Lecithin wird zu 252,0 bis 630,0 mg für 1 Liter angegeben und soll nach den meisten Angaben wesentlich vom Fettgehalt der Milch abhängig sein.

Bordas und *Raczkowsky*[1]) teilen mit, daß zwei Milchproben (eine mit 252 mg, die andere mit 365 mg Lecithin) bei 30 Minuten langem Erwärmen und Sterilisieren folgende Verluste an Lecithin erfuhren:

	Durch Erwärmen		Durch Sterilisieren bei 105 bis 110° Proz.
	auf freiem Feuer Proz.	im Wasserbade Proz.	
Verlust an Lecithin	28	12	30

Diese Verluste erscheinen reichlich hoch. Wir glauben, daß durch kurzes Aufkochen der Milch nennenswerte Verluste an Lecithin nicht auftreten.

δ) Weit sicherer erwiesen sind dagegen die *Verluste an Lecithin beim Aufbewahren der Eiernudeln.*

[1]) Ann. de Chim. analyt. appl. 8, 168, 1903.

J. Jaeckle[1]) machte als erster (1904) darauf aufmerksam, daß in *Eiernudeln* der Gehalt an Lecithin- (alkohollöslicher) Phosphorsäure beim Lagern *beständig abnimmt.* Diese Beobachtung ist dann von einer Reihe von Nahrungsmittelchemikern bestätigt worden, und *E. Nockmann*[2]) hat nachgewiesen, daß beim Aufbewahren der Eiernudeln in *trockener* Umgebung die Abnahme des Lecithins — selbst in der Wärme — nur gering ist, dagegen bei *feuchter* Lagerung — besonders in der Wärme — erheblich gesteigert wird. Der Lecithin-Phosphorsäuregehalt des Grießmehls scheint sich beim Aufbewahren auch in feuchter Wärme nicht zu vermindern.

A. Beythien und *P. Atenstädt*[3]) haben allerdings gefunden, daß die *Gesamtphosphorsäure* beim mehrmonatigen (bis 30 Monate) Lagern der Eiernudeln keine Abnahme erfährt, und schließen daraus, daß der Rückgang der *Lecithinphosphorsäure* nicht auf ein Entweichen flüchtiger Phosphorverbindungen zurückzuführen ist. Jedoch ist hierbei zu berücksichtigen, daß die beim Lagern der Eiernudeln abnehmende Menge Lecithin-Phosphorsäure absolut nur wenige (bis 45) Milligramme für 100 g Trockensubstanz betragen hat und diese nur 10 bis 15 Proz. der Gesamtphosphorsäure der Nudeln ausmacht, so daß die Abnahme der Lecithin-Phosphorsäure in der Gesamtphosphorsäure bei den natürlichen Schwankungen im Gehalt und bei den unvermeidlichen Analysenfehlern wohl nicht scharf genug in den analytischen Ergebnissen hervortreten kann. Es kann aber auch sein, daß der in den Eiernudeln aus dem Lecithin frei werdende Phosphor im Augenblick des Entstehens bei vorhandenem Luftzutritt sofort wieder zu Phosphorsäure oxydiert wird und als solche bestehen bleibt.

Wie der Vorgang aber auch sein möge, das Endergebnis der Wirkung im Tierkörper wird dasselbe sein, und wir glauben, auf Grund aller vorstehenden Versuche und Beobachtungen annehmen zu dürfen, *daß die Lipoide vorwiegend die Phosphatide bzw. Lecithine und die Sterine die Träger der Vitamine A und D bilden.*

5. *Aldehyde.*

Als auffällig und besonders eigenartig ist das regelmäßige Auftreten von *Aldehyden* unter den flüchtigen Stoffen beim Erhitzen der Nahrungsmittel anzusehen. Diese werden nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren qualitativ an der Spiegelbildung und quantitativ nach Überführung in die entsprechenden Säuren nachgewiesen. Als *flüchtige*, aus ihren Aldehyden entstandene Säuren erkannten wir bis jetzt *Ameisensäure, Essigsäure* und *Buttersäure*[4]). Über die Natur der *nichtflüchtigen*, aus Aldehyden entstandenen Säuren, welche bei gewöhnlicher Temperatur fest sind und der Menge nach die flüchtigen Säuren durchweg weit übertreffen, können wir bis jetzt noch nichts aussagen.

---

[1]) Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- und Genußmittel **7**, 513, 1904; **9**, 204, 1905.
[2]) Ebendaselbst **25**, 720, 1913.
[3]) Ebendaselbst **13**, 681, 1907.
[4]) Letztere am Geruche.

Bei Betrachtung vorstehender Untersuchungsergebnisse fällt sofort auf, daß diejenigen Nahrungsmittel, die als vitaminfrei oder -arm bezeichnet werden, wie z. B. Palmin, Olivenöl[1]), Eiklar, feinstes Weizenmehl und geschälter Kochreis beim Erhitzen keinen *Formaldehyd* oder nur in geringen Mengen geliefert haben, während die entsprechenden vitaminhaltigen Nahrungsmittel, wie Butter, Lebertran, Eigelb, Weizenkleie und Reisschälabfall deutliche Mengen Formaldehyd aufweisen. Auch ist es bemerkenswert, daß diejenigen Nahrungsmittel, welche außer an Vitamin A und D auch besonders reich an Vitamin B und C sind, die Gemüsearten und Obstfrüchte, beim Erhitzen die zwei- bis zehnfache Menge flüchtiger Aldehyde gegenüber den an Vitamin B und C ärmeren Nahrungsmitteln abspalten. Über die Beziehungen von Vitamin A und D zu den Phosphatiden und Sterinen vgl. vorstehend, S. 116 und 118.

6. *Einfluß des Kochens.*

Durch Kochen der Gemüse (Blumenkohl, Grünkohl und Spinat), ebenso beim Kochen von Fleisch (vgl. Tabelle I, Nr. 2, S. 110), geht ein erheblicher Teil der flüchtigen Stoffe (auch der Aldehyde) ins Kochwasser über. Dabei ist dann die Summe der in dem Kochrückstand verbliebenen und der ins Kochwasser übergegangenen einzelnen flüchtigen Stoffe nicht selten größer als die bei demselben Nahrungsmittel im frischen Zustande unter gleicher Behandlung gefundene Menge an flüchtigen Stoffen. Das Kochen hat weiter den Einfluß, daß die Verflüchtigung der abspaltbaren Stoffe bei den küchenmäßig gekochten Nahrungsmitteln bei niedrigerer Temperatur beginnt und schneller verläuft als bei den frischen, ungekochten Nahrungsmitteln; durch das einfache, küchenmäßige Kochen werden daher die Verbindungen, die flüchtige Stoffe abspalten, zweifellos schon gelockert, und so ist es wohl zu erklären, daß gekochte Nahrungsmittel im allgemeinen auf biologische Vorgänge bei der tierischen Ernährung weniger stark und weniger anhaltend wirken als ungekochte, obschon die absolute Menge der gekochten und ungekochten Nahrungsmittel an flüchtigen Stoffen mehr oder weniger gleich oder bei ersteren infolge der vorhergegangenen besseren Aufschließung etwas höher als bei letzteren ist.

Dieses Verhalten der flüchtigen Stoffe der Nahrungsmittel entspricht der allgemein bekannten Tatsache, daß die Vitamine ebenso

---

[1]) Zwei von uns untersuchte Proben *Olivenöl* lieferten beim Erhitzen ebenso wie der als vitaminfrei bezeichnete *Honig* geringe Mengen flüchtigen Formaldehyds. Möglicherweise sind diese für eine physiologische Wirkung nicht mehr ausreichend, vielleicht sind aber auch diese Nahrungsmittel, je nach der Gewinnungsweise, in der Beschaffenheit verschieden, so daß Wiederholungen auch der biologischen Versuche wünschenswert erscheinen.



wie die Enzyme der Nahrungsmittel durch Kochen der letzteren eine Einbuße in ihrer Wirkung erleiden.

7. Sonstige Beobachtungen über das Vorkommen von Aldehyden in den Nahrungsmitteln.

a) *J. Spinka*[1]) gibt z. B. an, daß in Nahrungsmitteln vielfach Aldehyde und Ketone vorkommen, ohne daß sie giftig sind. *S. Zilva*[2]) erhielt aus vergorenem (zuckerfreiem) und von Citronensäure befreitem Citronensaft Flüssigkeiten (mit nur 0,03 bis 0,07 Proz. Trockensubstanz), welche ammoniakalische Silberlösung reduzierten, Kaliumpermanganatlösung entfärbten, also *Aldehydreaktionen* zeigten und dabei *antiskorbutisch* wirkten. *H. v. Euler* und *J. Lindståll*[3]) unterwarfen den Verseifungsrückstand von Lebertran, der an sich schon ammoniakalische Silberlösung reduzierte, der Destillation im Vakuum und erhielten ein übel riechendes Destillat, das ammoniakalische Silberlösung und *Fehling*sche Lösung reduzierte, sowie fuchsinschweflige Säure rot färbte. *K. Farnsteiner*[4]) wies im Gärungsessig einen Körper von gleicher Eigenschaft, nämlich *Acetylcarbinol* ($CH_3 . CO . CH_2OH$), nach und konnte auch im Honig reduzierende Stoffe nachweisen. Endlich haben *Th. Curtius*[5]) und Mitarbeiter in den Blättern der verschiedensten Bäume regelmäßig den *Blätteraldehyd*, den *α, β*-Hexylenaldehyd ($CH_3 CH_2 . CH_2 . CH : CH . CHO$), gefunden und glauben, daß derselbe in genetischem Zusammenhang mit der Glykose steht; sie geben ferner an, daß bei der Kondensation von Formaldehyd in Gegenwart von Bleihydroxyd neben Zucker auch mit Wasserdampf flüchtige Aldehyde entstehen.

b) *S. Fränkel*[6]) und Mitarbeiter haben durch eine Reihe von Versuchen festgestellt, daß alkoholische und durch Äther von Fett befreite *Auszüge* aus *vitaminhaltigen* Nahrungsmitteln die *Hefengärung* beschleunigen, und da *C. Neuberg*[7]) gefunden hat, daß gerade *Aldehyde* und Ketoverbindungen ganz allgemein einen beschleunigenden Einfluß auf den Eintritt der alkoholischen Zuckerspaltung ausüben, so ist die Annahme berechtigt, daß in den Auszügen aus vitaminhaltigen Nahrungsmitteln auch Aldehyde bei der Gärbeschleunigung eine Rolle mitspielen. Der Einwurf *Fränkels*, daß die Gärbeschleunigung durch Auszüge aus vitaminhaltigen Nahrungsmitteln allmählich ansteigt und lange anhält, während bei dem im freien Zustande zugesetzten Aldehyd schnell eine bestimmte Höhe erreicht wird, dann aber wieder abfällt, läßt sich wohl so erklären, daß die Aldehyde und Keto-

[1]) Ber. f. d. ges. Physiol. **26**, 169, 1924.
[2]) Biochem. Journ. **18**, 632, 1924.
[3]) Chem. Centralbl. **1924**, II, 1816.
[4]) Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel **15**, 321, 598, 1908.
[5]) Sitzungsber. d. Heidelberger Akad. d. Wissensch. 1910; Chem. Centralbl. **1911**, I, 1143.
[6]) Diese Zeitschr. **112**, 204, 1920; **126**, 189, 227 und 265, 1922.
[7]) Ebendaselbst **88**, 145, 1918; **101**, 239, 276, 1920.



verbindungen (gleichsam als Coenzyme) an einen (gleichsam vitaphoren) Kern gebunden sind, die wenn sie in die gärende Flüssigkeit gebracht werden, sich *nach und nach* abtrennen und *lange* wirken, während die *auf einmal* zugefügten Aldehyde nach baldiger *Erreichung* eines Höhepunktes *ihre Wirkung erschöpft haben.*

c) *Neuberg* hat gezeigt[1]), daß bei der intramolekularen Atmung der Samenpflanzen mit dem „*Sulfit-Abfangverfahren*" Acetaldehyd als Zwischenstufe und des Abbaues angehäuft werden kann. Dann haben *G. Klein*[2]) und Mitarbeiter mitgeteilt, daß sie auch nach dem zweiten „*Abfangverfahren*" *C. Neubergs*, mittels „Dimedon" (Dimethylhydroresorcin), in *grünen Pflanzen*, bei der *Kohlensäureassimilation* das Zwischenerzeugnis *Formaldehyd* in Form von „*Formaldomedon*" und bei der *Atmung* der Pflanzen (Knospen, Blüten und Keimlingsgewebe) das Zwischenerzeugnis *Acetaldehyd* als „*Acetaldomedon*" nachweisen konnten, und zwar den Acetaldehyd in ebenso großer Ausbeute, wie ihn *C. Neuberg*[3]) im tierischen Gewebe gefunden hatte. Nach Angabe derselben Verfasser tritt ferner auch beim physiologischen *Abbau* von *Stärke* unter *Insulinbeigabe Acetaldehyd* auf und steigert sowohl tierisches wie pflanzliches Insulin die Bildung von Acetaldehyd um das Zwei- bis Dreifache.

In der Tat werden von einigen Vitaminforschern[4]) in Vitamin B und C (bzw. auch D) ein *insulinartiger Stoff* und ein *Coenzym* angenommen. Der insulinartige Stoff soll aus tierischen Organen (Tumoren) gewonnen werden können; er soll aber desgleichen in Pflanzen (Kartoffeln, Zwiebeln, Bohnenkeimlingen) enthalten sein, während sich das Coenzym angeblich auch aus obergäriger Hefe gewinnen läßt. Auch hierbei würde sich der schnelle Zerfall der Vitamine in der Weise erklären lassen, daß beim Aufbewahren infolge Zellenatmung oder -umsetzung das Coenzym (Covitamin) von dem insulinartigen Stoff (der Vitaminase) getrennt wird und hierdurch das Vitamin seine eigenartige Wirkung verliert.

d) Endlich kann man in den Vitaminen vielleicht *reversible Kolloide* annehmen, die leicht abspaltbare Stoffgruppen enthalten. Hierdurch werden, wenn sie in frischem, stark dispersem (Sol-) Zustande in den Tierkörper gelangen, Reaktionen hervorgerufen, welche beim Übergang vom Sol- in den Gelzustand (durch Lagern, Erhitzen usw.) die Stoffgruppen abspalten, dadurch ihre eigenartige physiologische Wirkung verlieren, diese aber durch Einwirkung von ultraviolettem Licht unter Wiederherstellung des Solzustandes (wie bei altbackenem Brot durch Erhitzen) wiedererlangen können.

---

[1]) Diese Zeitschr. **151**, 167, 1924; **160**, 256, 1925.

[2]) Naturwissenschaften **13**, 21, 1925.

[3]) Vgl. diese Zeitschr. **89**, 365, 1918; **96**, 281, 1919; **108**, 117, 1921; **114**, 134, 1922 usw.

[4]) Vgl. *C. Funk* in E. Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. 1925, H. 9, S. 865.

8. Einfluß des ultravioletten Lichtes auf die Bildung der Vitamine.

Von verschiedenen Seiten wird (vgl. S. 115) behauptet, daß durch kurze Bestrahlung der Nahrungsmittel mit ultraviolettem Licht Vitamine gebildet bzw. aus den Spaltlingen wieder erzeugt, ja daß Avitaminosen (z. B. Rachitis) durch Bestrahlung der Tiere selbst mit ultraviolettem Licht geheilt werden können. An sich ist eine solche Wirkung des ultravioletten Lichtes sowohl für die Neubildung von labilen, ungesättigten Verbindungen, wie von Peroxyden und Ozoniden (bei intermediärer Bildung von Ozon bzw. Wasserstoffperoxyd), als auch von Vitaminasen (im vorstehenden Sinne) nicht ausgeschlossen[1]). Wissen wir doch, daß z. B. altbackenes Brot durch einfaches Erhitzen ohne Zusatz von Wasser wieder frischbacken wird[2]).

Baudisch und *Welo*[3]) vergleichen das Verhalten der vitaminhaltigen Nahrungsmittel zutreffend mit dem einiger Heilwässer bzw. von Ferrobicarbonat und Ferrocarbonat. Letztere zersetzen im *frisch gefällten* Zustande genau wie frisch geförderte Heilwässer Wasserstoffsuperoxyd, nehmen begierig Sauerstoff der Luft auf und aktivieren ihn[4]), so daß sie Milchsäure, Zucker und andere oxydativ abbauen. Ebenso verhält sich Natriumpentacyano-aquo-ferroat; dieses färbt — im frischen Zustande — ebenso wie eine Spur Blut eine Lösung von Benzidinchlorhydrat in 3proz. Wasserstoffsuperoxyd tiefblau und befördert in Mengen von 0,02 mg in 1 ccm das Wachstum gewisser Bakterien. Durch kurze Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, ebenso beim Altern nimmt die aktivierende Eigenschaft dieser Verbindung schnell ab; andererseits kann letztere durch Bestrahlung von Ferrocyankalium neu gewonnen werden. Ebenso sollen

---

[1]) Die innerhalb und außerhalb des Tierkörpers auftretenden Spaltlinge der labilen ungesättigten Verbindungen der Peroxyde, Ozonide oder Vitaminasen oder Kolloide werden sich verschieden verhalten. Die im Tierkörper bzw. bei biologischen Vorgängen (Hefengärung) abgespaltenen Stoffgruppen werden im Entstehungszustande bei den sonstigen Umsetzungen gleich weitere Verwendung finden; die beim Aufbewahren, Kochen, Braten usw. entstehenden Spaltlinge (Schwefelwasserstoff, Mercaptan, Phosphorverbindungen und Aldehyde) werden je nach der Behandlung zum Teil verflüchtigt, zum Teil in den Nahrungsmitteln als solche bestehen bleiben, im Tierkörper aber nicht mehr die *eigenartige* (antiavitaminöse) Wirkung der Muttersubstanz äußern.

[2]) Man nimmt an, daß im frischen Brot eine kolloidchemische Verbindung zwischen Kleber und Stärke besteht, und daß diese beim Aufbewahren zerfällt, indem beide Komponenten aus dem Sol- in den Gelzustand übergehen, daß aber, wenn der Wassergehalt des Brotes nicht unter 30 Proz. sinkt, durch einfaches Erhitzen auf 70 bis 80° die ursprüngliche Verbindung wiederhergestellt wird.

[3]) Naturwissenschaften **13**, 749, 1925.

[4]) Nach *L. Fresenius* und *K. Harpuder* (Klin. Wochenschr. **5**, II, 2304, 1926) verhalten sich künstliche Gemische von Ferroion, Manganion und Bicarbonation in gleicher Weise, jedoch tritt die katalytische Reaktion nur bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration auf.



in den grünen Blättern (und in Nahrungsmitteln selbst) unter dem Einfluß des Sonnenlichtes gewisse *molekulare Zustände* hervorgerufen werden, welche in dieser *labilen* Form zu *spezifischen Biokatalysatoren werden.*

Ob und welche der vorstehend angenommenen Ansichten über die Natur der Vitamine die richtige ist, darüber müssen noch weitere Untersuchungen Aufklärung geben. Auch das angewendete Verfahren bedarf noch der Vervollkommnung und Erweiterung; denn wenn auch die aufgeführten und vielleicht noch andere flüchtige Stoffe nicht in Beziehung zu den Vitaminen stehen sollten, so sind sie der Art wie Menge nach bei den einzelnen Nahrungsmitteln doch so verschieden, daß sie schon aus *dem* Grunde, um feinere Unterschiede zwischen letzteren festzustellen, weiterhin Berücksichtigung verdienen.

Untersuchungen über Diastasesekretion.

I. Mitteilung:

Die Freilegung der Diastase in den Zellen der Speicheldrüse.

Von

E. J. Lesser.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 24. Februar 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

I.

Die Glandula parotis der weißen Maus liegt lateral vom Kieferwinkel an den häutigen Gehörgang angewachsen (s. Abbildung 1). Sie wiegt

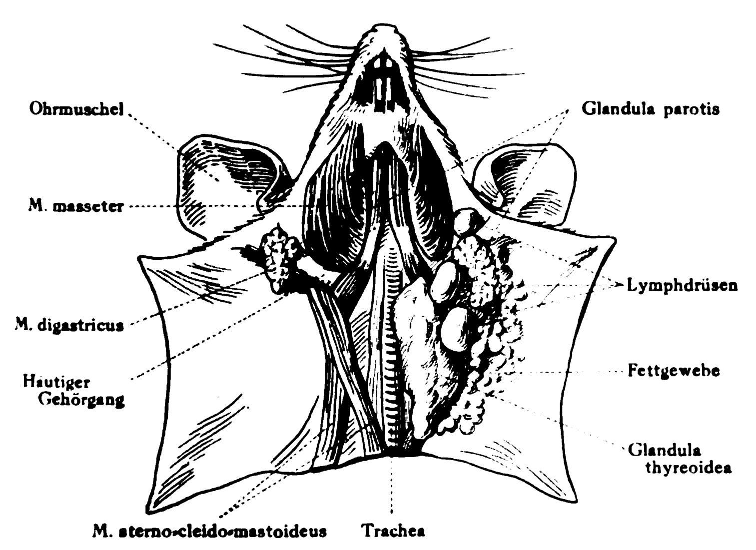


Abb 1. Die Haut ist medial, vom Sternum bis zu den Schneidezähnen, bei dem auf dem Rücken liegenden Tier durchschnitten und seitswärts abpräpariert. Rechts ist alles Fettgewebe und alle Drüsen außer der Parotis entfernt, links ist nur die Haut zurückpräpariert. Halbschematisch.

bei erwachsenen männlichen Tieren zwischen 10 und 20 mg. Die rechte und die linke Drüse wurde sofort nach der Tötung des Tieres so heraus-

präpariert, daß möglichst wenig Fettgewebe daran hängen blieb und möglichst wenig Drüsengewebe im Tier belassen wurde. Jede Drüse wurde auf einer Torsionswage (*Hartmann* und *Braun*) rasch auf 0,2 mg gewogen und in einer kleinen Porzellanreibschale möglichst fein zerrieben. Nach der Verreibung wurde die Reibschale quantitativ mit kochsalzhaltigem Phosphatgemisch (p_H 6,8) ausgespült und die Spülflüssigkeit im Meßkölbchen auf 10 ccm gebracht. Die Meßkölbchen blieben einige Stunden bei Zimmertemperatur stehen, dann wurde von ungelöst gebliebenen Gewebsfetzen abfiltriert und in einem kleinen Bruchteil des Filtrats die Diastasebestimmung nach *Rona* und *van Eweyk*[1]) ausgeführt (Einzelheiten siehe Abschnitt II, zur Methodik). Es fanden sich dann im Extrakt der linken und der rechten Drüse nahezu gleiche Diastasemengen. Die Diastasebestimmung nach *Rona* und *van Eweyk* benutzt als Maß der Diastasewirkung die Reaktionskonstante der monomolekularen Reaktion. Diese Konstante mit 100 multipliziert und durch die Anzahl Milligramme frischer Drüsensubstanz, welche der beim Versuch benutzten Extraktmenge entspricht, dividiert, ergibt den Diastasewert (D. W.) von 100 mg frischer Drüse, also

$$\text{D. W.} = \frac{100\,\text{K}}{\text{mg Drüse}}$$

Eine Anzahl solcher Werte, wie sie bei unbeeinflußten Drüsen erhalten wurden, sind in Tabelle I zusammengestellt. Man sieht, daß

Tabelle I.

Nr.	Diastasewert (D. W.) der		Differenz
	rechten Drüse	linken Drüse	Proz.
1	3,58	3,15	+ 12
2	5,44	5,30	+ 2,6
3	4,57	4,67	— 2,2
4	3,22	2,82	+ 12,3
5	2,75	2,79	— 1,45
6	2,01	2,21	— 10
Mittelwert:	3,595	3,490	Δ = 2,9

die rechte und die linke Drüse maximal um 12 Proz. des D. W. der rechten Drüse voneinander abweichen. Der Mittelwert aus sechs Bestimmungen weicht aber nur noch, da bald die rechte, bald die linke Drüse einen höheren D. W. aufweist, um 3 Proz. voneinander ab. Bei Drüsen, welche vorher bestimmten Beeinflussungen unterworfen waren, haben sich gelegentlich größere Abweichungen gezeigt. Im ganzen

[1]) *P. Rona* und *C. van Eweyk*, diese Zeitschr. **149**, **174**, **1924**.

verfüge ich bisher über einige 60 Versuche; dabei traten viermal Differenzen von 18 bis 19 Proz., sechsmal von 23 bis 29 Proz. auf. Diese Differenzen sind wahrscheinlich alle Versuchsfehler. Wenn man Mittelwerte aus etwa fünf Versuchen bildet, so fallen sie entweder ganz oder fast ganz heraus. Der Vergleich des D. W. der rechten und der linken Drüse ermöglicht es daher bei der Anstellung einer genügenden Anzahl von Versuchen mit Sicherheit zu entscheiden, ob bei einer bestimmten Beeinflussung der Drüsen eine Zu- oder Abnahme des D. W., d. h. Neubildung oder Zerstörung von Diastase eingetreten ist.

Der D. W. der Drüsen verschiedener Tiere schwankt stark. Die meisten Werte (62 von 112) liegen zwischen 4 und 6. Der höchste Wert betrug 11,3, der niedrigste 1,93. Die Abb. 2 und die Tabelle II zeigen

Tabelle II.

D. W.	Häufigkeit der Fälle		D. W.	Häufigkeit der Fälle	
	absolut	in Proz.		absolut	in Proz.
1—2	1	0,9	7— 8	6	5,3
2—3	9	8,0	8— 9	1	0,9
3—4	14	12,5	9—10	5	4,5
4—5	32	28,5	10—11	2	1,8
5—6	30	26,8	11—12	1	0,9
6—7	11	9,8			

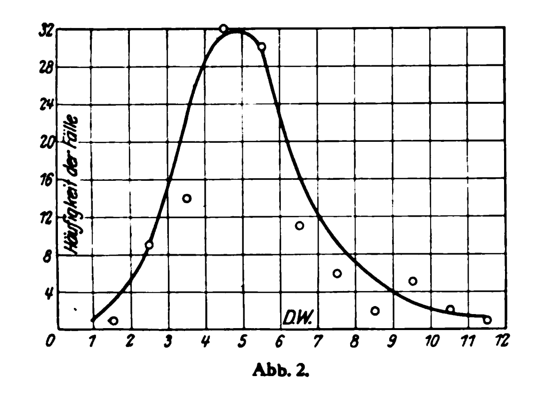


Abb. 2.

die Häufigkeit, mit der die einzelnen Werte auftreten. Es wird eine interessante Aufgabe sein, zu versuchen, ob man herausfinden kann, unter welchen Bedingungen hohe und unter welchen Bedingungen niedere D. W. auftreten, ferner ob man durch entsprechende Vorbehandlung der Tiere die Höhe des D. W. beeinflussen kann. Der Blutgehalt der Drüse bedingt, soweit die Blutdiastase in Betracht kommt, keine Fehler bezüglich des D. W. Das Blutserum männlicher

weißer Mäuse ergab für 0,1 ccm eine Reaktionskonstante von 0,00292. Wenn in 100 mg Drüse selbst 0,01 ccm Serum enthalten wären, so betrüge die entsprechende Diastasemenge von 0,0003 erst 0,015 Proz., des niedrigsten D. W., der gefunden wurde. Der D. W. der Parotis beträgt also das 600- bis 4000 fache des Diastasegehalts des Blutserums.

Wenn man nun die Drüsen sofort nach der Wägung in die von *O. Warburg*[1]) beschriebenen Tröge bringt und sie in Ringerlösung nach den von *Warburg* gegebenen Vorschriften bei 38° atmen läßt, so erhält man im Mittel aus 61 Bestimmungen pro 1 mg frischer Drüse in einer Stunde eine Sauerstoffzehrung (V_{O_2}) von 1,78 cmm. Die Trockensubstanz wurde einmal bei sechs Drüsen gleichzeitig ermittelt und ergab sich zu 30,2 Proz. Daraus ergibt sich für die *Warburg*sche Konstante Q_{O_2} der Wert $Q_{O_2} = 5{,}89$, während *Warburg, Posner* und *Negelein*[2]) unter etwas abweichenden Bedingungen, da sie in kohlensäurehaltiger Atmosphäre an Gewebs*schnitten* arbeiteten, für das Pankreas und die Submaxillaris des Kaninchens Werte von 4,6 und 4,1 für Q_{O_2} erhalten haben. Aus den Versuchen von *Barcroft* und *Müller*[3]) an der Submaxillaris der Katze errechnet sich für $V_{O_2}\left(\frac{\text{cmm } O_2}{\text{Stunden} \times \text{mg}}\right)$ für die ruhende Drüse ein maximaler Wert von 1,62, während der maximale Wert, der in diesen Versuchen für die Parotis der weißen Maus gefunden wurde, 2,51 cmm pro Milligramm und Stunde betrug. Aus der von *Warburg* angegebenen Formel für die Grenzschichtdicke d_1, bei der in Sauerstoff-Atmosphäre noch ausreichende Sauerstoffversorgung der Gewebe durch Diffusion vorhanden ist, errechnet sich für $V_{O_2} = 1{,}78$ die Grenzschichtdicke zu 0,61 mm und für $V_{O_2} = 2{,}51$ zu 0,52 mm. Ich habe einige annähernde Bestimmungen der Dicke der Drüse nach der von *Warburg*, a. a. O., S. 323 angegebenen Methode gemacht. Dabei ergab sich eine zwischen 0,3 und 0,4 mm liegende Dicke. Dementsprechend blieb die V_{O_2} während der ersten 60 Minuten fast immer konstant, häufig auch noch in den folgenden 30 bis 40 Minuten, doch fand hier eine leichte, etwa 10 Proz. betragende Abnahme nicht selten statt. (Vgl. Abb. 3.) Über 90 Minuten wurden die Atmungsversuche in der Regel nicht ausgedehnt. Der niedrigste unter 61 Bestimmungen

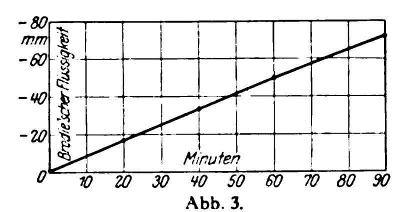


Abb. 3.
Versuch vom 1. Februar 1927. Sauerstoffzehrung in Millimeter *Brodie*scher Flüssigkeit. Ablesung alle 10 Minuten. Drüse unbeeinflußt in Ringerlösung.

[1]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **142**, 317, 1923.
[2]) *Warburg, Posner* und *Negelein*, diese Zeitschr. **152**, 329, 1924.
[3]) *Barcroft* und *Müller*, Journ. of physiol. **44**, 258, 1912.

an der normalen Drüse gefundene Wert für V_{O_2} betrug 1,01, der höchste 2,51. Solche stark abweichenden Werte traten aber nur äußerst selten auf. Die meisten Werte lagen zwischen 1,5 und 2,3 (49 von 61). Eine Übersicht über die Häufigkeit, mit der die einzelnen Werte vorkamen, zeigt die Tabelle III.

Tabelle III.

Oxydationsgeschwindigkeit in cmm pro Std. und mg frischer Drüse	Häufigkeit der Fälle		Oxydationsgeschwindigkeit in cmm pro Std. und mg frischer Drüse	Häufigkeit der Fälle	
	absolut	in Proz.		absolut	in Proz.
1,0—1,1	1	1,6	1,8—1,9	11	18,0
1,1—1,2	1	1,6	1,9—2,0	5	8,2
1,2—1,3	1	1,6	2,0—2,1	6	9,8
1,3—1,4	2	3,2	2,1—2,2	6	9,8
1,4—1,5	4	6,5	2,2—2,3	1	1,6
1,5—1,6	6	9,8	2,3—2,4	1	1,6
1,6—1,7	8	13,1	2,4—2,5	1	1,6
1,7—1,8	7	11,4			

V_{O_2} der rechten und der linken Drüse weicht in der Regel um etwa 10 Proz. voneinander ab. Unter den in Tabelle IV zusammengestellten sechs Versuchen an unbeeinflußten Drüsen kommen zweimal erheblich größere Abweichungen von 23 bis 30 Proz. vor. Es gilt hier das gleiche, was bereits oben für die Bestimmung des D. W. der rechten und der linken Drüse gesagt wurde. Die Abweichungen im Einzelversuch sind wahrscheinlich Versuchsfehler. Sie fallen — wie der Mittelwert der Tabelle IV zeigt — bei Anstellung einer größeren Anzahl von Versuchen und Ziehung des Mittelwertes mehr oder weniger heraus.

Tabelle IV.

Normalversuche.

Datum	cmm O_2 pro mg und Stunde		Δ in Proz. des Wertes der rechten Drüse
	Rechte Drüse	Linke Drüse	
30. VI.	1,84	1,59	— 14,4
21. VII.	2,12	1,91	— 9,9
11. IX.	1,71	1,87	+ 9,3
4. I.	1,41	1,84	+ 30,5
5. I.	1,92	2,03	+ 5,7
18. I.	1,50	1,15	— 23,2
Mittelwert:	1,75	1,73	— 1,15

Untersucht man die Ringerlösung, in der die Drüsen geatmet haben, auf Diastase, so findet man, daß sie immer Diastase enthält. Der D. W. der Drüse setzt sich dann aus zwei Werten zusammen, nämlich aus der Diastasemenge, die am Schluß des Versuchs in der

Ringerlösung (kurz: außen) enthalten ist und derjenigen, welche noch in der Drüse (kurz: innen) verblieben ist. Aus den „außen“ und „innen“ gefundenen Konstanten K_A und K_I wird D. W. A. und D. W. I. in derselben Weise berechnet, wie dies oben für D. W. angegeben wurde. Also ist

$$\text{D. W. A.} = \frac{K_A \cdot 100}{\text{mg Drüsensubstanz}}, \qquad \text{D. W. I.} = \frac{K_I \cdot 100}{\text{mg Drüsensubstanz}}$$

und D. W. = D. W. A. + D. W. J.

Es entsteht die Frage, ob sich der D. W. ändert, wenn bei diesen Versuchen in vitro ein ansehnlicher Bruchteil der Gesamtdiastase nach außen tritt. Die Frage ist leicht zu entscheiden. Man präpariert die rechte und die linke Drüse, verreibt die eine sofort nach der Wägung und bestimmt ihren D. W. Die andere läßt man nach den Vorschriften *Warburgs* 90 Minuten in Ringerlösung atmen und bestimmt dann D. W. A. und D. W. I. Dabei ergab sich z. B.:

linke Drüse sofort verrieben.	D. W.	=	5,30
rechte Drüse hat 90 Minuten	D. W. A.	=	0,86
in 0,5 ccm Ringerlösung	+ D. W. I.	=	+ 4,58
geatmet, $V_{O_2} = 1{,}75$	D. W.	=	5,44

Es ändert sich also der D. W. bei dem Austritt von Diastase aus der Drüse nicht.

D. W. A. ist nun eine Größe, welche von der Zeit abhängig ist. Um Versuche von etwas verschieden langer Dauer miteinander vergleichen zu können, muß D. W. A. stets für eine bestimmte Zeit angegeben werden, z. B. 100 Minuten, nach der Gleichung

$$\text{D. W. A.}_{\cdot 100} = \frac{\text{D. W. A.} \cdot 100}{\text{Versuchsdauer in Minuten}}.$$

Für manche Zwecke ist es nun, wie wir sehen werden, wesentlich, die Größe D. W. $\text{A.}_{\cdot 100}$ zu D. W. in Beziehung zu setzen. Dies geschieht, indem D. W. $\text{A.}_{\cdot 100}$ in Prozenten von D. W. ausgedrückt wird. Also

$$\text{D. W. A.}_{\cdot 100}\,\text{Proz.} = \frac{100 \times \text{D. W. A.}_{\cdot 100}}{\text{D. W.}}.$$

In der Tabelle V sind sämtliche Werte zusammengestellt, die bei Versuchen erhalten wurden, bei denen die rechte und die linke Drüse unbeeinflußt verschieden lange Zeit in Ringerlösung geatmet haben. Die Tabelle gibt die Werte für V_{O_2}, D. W., D. W. $\text{A.}_{\cdot 100}$ Proz. und D. W. $\text{A.}_{\cdot 100}$ wieder. Wenn wir wiederum von den bei den einzelnen Versuchen auftretenden Abweichungen absehen, welche durch methodische Fehler bedingt sind und nur den Mittelwert berücksichtigen, so ergibt sich: *Die rechte und die linke Drüse haben gleiche Oxydations-*

Tabelle V.

Normalversuch.

Datum 1926	V_{O_2}		D. W.		D. W. $A_{\cdot 100}$ Proz.		D. W. $A_{\cdot 100}$		Versuchsdauer
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	
21. VII.	2,12	1,91	2,75	2,79	13,0	7,2	0,36	0,20	97′
11. IX.	1,71	1,87	2,01	2,21	10,0	11,0	0,20	0,25	90
1927									
4. I.	1,44	1,84	2,82	3,22	18,4	15,5	0,52	0,50	104
5. I.	1,92	2,03	4,67	4,57	13,5	18,2	0,63	0,83	102
18. I.	1,50	1,15	3,15	3,58	16,6	19,0	0,52	0,68	105
Mittelwert:	1,74	1,76	3,08	3,27	14,6	14,9	0,45	0,49	

geschwindigkeit, die rechte und die linke Drüse enthalten zu Beginn des Versuchs die gleiche Diastasemenge. Aus der rechten und der linken Drüse geht während 100 Minuten die gleiche Diastasemenge nach außen, welche in Prozenten des D. W. 7 bis 19 Proz. beträgt, im Mittel 14,75 Proz. D. W. $A_{\cdot 100}$ beträgt zwischen 0,2 und 0,8, im Mittel 0,47.

Die nächste Frage, die entsteht, ist: Wie verläuft der Austritt von Diastase nach außen zeitlich? Nimmt die in der Zeiteinheit austretende Diastasemenge mit längerer Versuchsdauer zu oder ab? Um die Frage zu entscheiden, wurde die Versuchsdauer stark abgekürzt. Nachdem die eine Drüse 25 bis 40 Minuten in einem Gefäß I geatmet hatte, wurde sie in ein Gefäß II übertragen, wo sie 30 bis 40 Minuten blieb, und kam dann noch für 30 bis 40 Minuten in ein Gefäß III. Die zweite Drüse blieb dagegen während des ganzen Versuchs in ein und demselben Gefäß. Diese Versuchsanordnung hat die Unannehmlichkeit, daß V_{O_2} nur aus 10 bis 20 Minuten gewonnen werden kann, wodurch die Genauigkeit des Wertes herabgesetzt wird; ferner, daß D. W. als Summe von vier Einzelmessungen erhalten wird, was gleichfalls die Genauigkeit dieses Wertes herabsetzt. Eine Übersicht über drei solche Versuche an unbeeinflußten Drüsen gibt Tabelle VI.

Tabelle VI.

Normalversuch, zeitlicher Verlauf.

Datum 1927	D. W.		D. W. $A_{\cdot 100}$ Proz.		D. W. $A_{\cdot 100}$ links	D. W. $A_{\cdot 100}$ rechts Periode		
	rechts	links	rechts	links		I	II	III
4. I.	2,82	3,22	18,4	15,5	0,50	0,66	0,55	0,39
5. I.	4,67	4,57	13,5	18,2	0,83	0,75	0,62	0,54
18. I.	3,15	3,58	16,6	19,0	0,68	0,64	0,49	0,46
Mittelwerte:	3,55	3,79	16,2	17,6	0,67	0,68	0,55	0,46

Man erkennt aus der Tabelle VI zunächst, daß die Übereinstimmung der Werte für D. W. rechts und links sich, trotzdem der eine Wert auf zwei, der andere auf vier Einzelmessungen beruht, innerhalb der ge-

wöhnlichen Grenzen hält. Dasselbe gilt für die Werte von D.W.A.$_{100}$ Proz. *Der Wert von D. W. A.$_{100}$ sinkt während der drei aufeinanderfolgenden Perioden von je etwa 30 Minuten dauernd ab.* Daraus möchte man schließen, daß das Austreten von Diastase nicht auf „Absterbeerscheinungen" der Drüse beruht, die eine Folge der nicht vollkommen physiologischen in-vitro-Bedingungen sind. Gegen diese Überlegung ist aber ein Einwand möglich. Infolge des Austretens von Diastase aus der Zelle ist am Anfang der Periode II weniger Diastase in der Drüse vorhanden, als am Anfang der Periode I, und erst recht ist dies am Anfang der Periode III der Fall, da ja eine Neubildung von Diastase bei diesen Versuchen niemals nachweisbar war. Wenn die in einer bestimmten Zeit aus der Drüse austretende Diastasemenge stets ein bestimmter Bruchteil der Gesamtdiastase in der Drüse ist, muß der absolute Wert der austretenden Diastase dauernd sinken. Drückt man diesen aber in Prozenten der jeweils am Anfang der Periode in der Drüse vorhandenen Diastasemenge aus, so müßte dieser Wert, wenn unsere Annahme richtig ist, konstant sein. Es fragt sich, wie sich die Werte für die austretende Diastase in den einzelnen aufeinanderfolgenden Perioden zueinander verhalten, wenn sie, nach Reduzierung auf gleiche Versuchsdauer, auf die jeweils am Anfang jeder Periode in der Drüse vorhandene Diastasemenge bezogen werden. Führen wir eine solche Berechnung einmal z. B. am Versuch vom 5. Januar 1927 durch.

In diesem Versuch dauerte die erste Periode 28 Minuten. In dieser Zeit trat, pro 100 mg Drüse berechnet, eine Menge von 0,21 Diastase aus. Die zweite Periode dauerte 37 Minuten, der Diastaseaustritt betrug pro 100 mg Drüse 0,23. Die dritte Periode dauerte 37 Minuten, der Diastaseaustritt betrug 0,20. In der Drüse ergab sich nach Schluß des Versuchs D. W. I. zu 4,03.

Demnach ist D. W. = 0,21 + 0,23 + 0,20 + 4,03 = 4,67.

Am Anfang von Periode 1 ist D. W. I. = D. W. = 4,67
„ „ „ „ 2 „ D. W. I. = D. W. − 0,21 = 4,46
„ „ „ „ 3 „ D. W. I. = 4,46 − 0,23 = 4,23

D. W. A.$_{100}$ ist für Periode 1 0,75
D. W. A.$_{100}$ „ „ „ 2 0,62
D. W. A.$_{100}$ „ „ „ 3 0,54

Wird D. W. A.$_{100}$ in Prozenten des am Anfang jeder Periode vorhandenen D. W. I. ausgedrückt, so ergibt sich für Periode

$$1 \quad \frac{100 \times 0{,}75}{4{,}67} = 16{,}0.$$

$$2 \quad \frac{100 \times 0{,}62}{4{,}46} = 13{,}9.$$

$$3 \quad \frac{100 \times 0{,}54}{4{,}23} = 12{,}8.$$

Führt man die gleiche Rechnung auch für die beiden anderen Versuche durch, so ergibt sich:

Tabelle VII.

Datum	Periode I	Periode II	Periode III
4. I. 1927	23,5	20,7	14,8
18. I.	20,4	16,4	16,4
5. I.	16,0	13,9	12,8
Mittelwert:	20,0	17,0	14,7

Die Tabelle VII zeigt, daß die in 100 Minuten austretende Diastasemenge in Prozenten des D. W. I. am Anfang jeder Periode ausgedrückt, mit der Zeit absinkt, und zwar nach 100 Minuten ungefähr auf drei Viertel des Anfangswertes. Während in der ersten Periode 20 Proz. vom D. W. I. herausgehen, treten in der dritten Periode nur noch 15 Proz. aus. *D. W. A. ist also kein konstanter Bruchteil vom D. W. I.*

Ein ganz anderes Verhalten zeigt die abgetötete Drüse. Am 24. November wurde eine Drüse abgetötet durch 35 Minuten dauerndes Einbringen in 0,5 ccm Ringerlösung, die in 100 ccm 5,2 ccm Propylalkohol enthielt. Bereits nach 20 Minuten war keine Sauerstoffzehrung mehr vorhanden. Die Drüse wurde dann für 36 Minuten in 0,5 ccm reine Ringerlösung übertragen, aber weder jetzt, noch nach erneuter Übertragung in frische Ringerlösung für wiederum 36 Minuten trat eine Sauerstoffzehrung auf. Die Kontrolldrüse der anderen Seite zeigte während des ganzen Versuchs konstant die ungewöhnlich niedrige V_{O_2} von 1,30. D. W. $A._{100}$ Proz. betrug bei der Kontrolldrüse 19. Die abgetötete Drüse ergab, berechnet für 100 mg Drüse in der ersten Periode 2,33 Diastase außen, in der zweiten 1,62, in der dritten 0,9, während sich am Schluß des Versuchs in der Drüse noch ein D. W. I von 1,34 fand.

Demnach ist D. W. = 2,33 + 1,62 + 0,9 + 1,34 = 6,19 und
D.W.I. der ersten Periode ist 6,19, D.W.$A._{100}$ 6,7 oder 108 Proz. vom D.W.I.
D.W.I. „ zweiten „ „ 3,86, D.W.$A._{100}$ 4,5 „ 116 „ „ D.W.I.
D.W.I. „ dritten „ „ 2,24, D.W.$A._{100}$ 2,5 „ 112 „ „ D.W.I.

d. h.: Bei der abgetöteten Drüse geht in jeder Minute derselbe Bruchteil der gesamten in der Drüse noch vorhandenen Diastasemenge heraus, wodurch die absolute Menge der in der Zeiteinheit austretenden Diastase dauernd sinkt. Die abgetötete Drüse verhält sich also wie ein mit Diastaselösung gefüllter, für Diastase permeabler Dialysierschlauch, der gegen eine große Menge Außenflüssigkeit dialysiert wird. D. W. $A._{100}$ Proz. beträgt etwa das Vierfache des Wertes der Kontrolldrüse.

Der Vergleich des zeitlichen Verlaufs des Austretens von Diastase aus der lebenden und aus der abgetöteten Drüse ergibt also, daß in der

mit Propylalkohol abgetöten Drüse die gesamte Diastase diffusibel ist, denn die in der Zeiteinheit austretende Diastasemenge ist dem Gesamtgehalt an Diastase in jedem Augenblick proportional. In der lebenden Zelle ist dagegen nur ein Bruchteil diffusibel, der größere Teil ist in der Zelle irgendwie gebunden. Die in der Zeiteinheit austretende Diastasemenge ist in jedem Augenblicke der in der Drüse enthaltenen *diffusiblen* Diastasemenge proportional, *nicht aber der Gesamtmenge an Diastase*, welche der Summe der diffusiblen und der gebundenen Diastase entspricht. Daher sinkt der in der Zeiteinheit austretende, auf die jeweils vorhandene Gesamtdiastasemenge bezogene Bruchteil dauernd ab.

Die in den Tabellen VIII und IX zusammengestellten Versuche zeigen, *daß man den Austritt von Diastase aus der Drüse durch Pilocarpin und Adrenalin steigern kann. Dagegen ist es mir bisher nicht gelungen, durch Atropin eine Beeinflussung der Drüse zu erhalten.* Die verwendeten Atropindosen betrugen 1,2, 1,8, 2,4, 3 und 4 mg Atropin. sulfur. in 100 ccm Ringerlösung. Dadurch wurde weder V_{O_2} noch D. W., noch D. W. A. beeinflußt.

Tabelle VIII.
Adrenalinversuche.

Datum 1926	V_{O_2}		D. W.		D. W. A.$_{100}$ Proz.		D. W. A.$_{100}$		Dauer der Einwirkung
	Adrenalin	Ringerlösung	Adrenalin	Ringer	Adrenalin	Ringer	Adrenalin	Ringer	
16. VII.	2,18	2,07	3,69	4,07	46,0	14,2	1,69	0,58	88′
20. VII.	1,83	1,41	—	—	—	—	2,56	0,79	87
26. VII.	1,55	1,67	—	—	—	—	1,08	0,39	94
28. X.	2,05	1,38	5,65	5,37	55,5	13,1	3,15	0,70	90
9. XI.	1,31	1,65	4,03	5,50	52,0	14,7	2,10	0,81	81
12. XI.	2,17	2,13	9,38	—	39,5	—	3,71	—	76
1927									
6. I.	1,82	1,52	5,24	4,84	67,8	14,8	3,55	0,72	28
15. I.	1,85	2,12	—	—	—	—	—	—	92
Mittelwert:	1,84	1,74	4,65	4,94	55,3	14,2	2,36	0,67	

Die in Tabelle VIII zusammengestellten Adrenalinversuche sind mit Adrenalinkonzentrationen von 1 : 250000 und 1 : 500000 Ringerlösung angestellt. Wie die Mittelwerte zeigen, wird V_{O_2} und D. W. durch Adrenalin nicht beeinflußt. D. W. A.$_{100}$ Proz. und D. W. A.$_{100}$ dagegen sind sehr stark erhöht, beide etwa auf das Vierfache des Wertes der Kontrolldrüsen. Der zeitliche Verlauf des Diastaseaustritts unter Adrenalinwirkung wurde in dem Versuch am 6. Januar 1927 geprüft. Die Adrenalindrüse kam zunächst für 28 Minuten in eine Lösung von einem Teil Adrenalin auf 500000 Teile Ringer, dann in Periode II für 37 Minuten in reine Ringerlösung und in Periode III noch einmal für 37 Minuten in reine Ringerlösung. Es ergab sich in Periode I 0,96,

in Periode II 0,59, in Periode III 0,48 Diastase außen, am Schluß war D. W. I. 3,21. Demnach ist D. W. = 0,96 + 0,59 + 0,48 + 3,21 = 5,24.

Periode 1: D.W.I. = D.W. = 5,24, D.W.A.$_{100}$ = 3,55 oder 67 Proz. vom D.W.I.
Periode 2: D.W.I. = 5,24 − 0,96 = 4,28, D.W.A.$_{100}$ = 1,59 oder 37 Proz. vom D.W.I.
Periode 3: D.W.I. = 4,28 − 0,48 = 3,80, D.W.A.$_{100}$ = 1,30 oder 34 Proz. vom D.W.I.

Wir sehen, der zeitliche Verlauf entspricht dem bei den unbeeinflußten Drüsen. Wenn die in jeder Periode austretende Diastasemenge in Prozenten der am Beginn der Periode in der Drüse noch vorhandenen Gesamtdiastase ausgedrückt wird, sinkt der so erhaltene Wert dauernd ab. Besonders stark von Periode I zu Periode II, noch eben angedeutet von Periode II zu Periode III. Der Wert der Periode III beträgt nur noch die Hälfte des Wertes der Periode I. Dabei ist aber D. W. A.$_{100}$ in Periode III immer noch gegenüber dem D. W. A.$_{100}$ der normalen Drüse stark erhöht, beide Zahlen sind für

die Adrenalindrüse 1,30
„ Normaldrüse 0,72

Die Pilocarpinversuche sind in Tabelle IX zusammengestellt.

Tabelle IX.

Pilocarpin.

Datum 1926	V_{O_2}		D. W.		D. W. A.$_{100}$ Proz.		D. W. A.$_{100}$		Dauer der Einwirkung
	Pilocarpin	Ringer	Pilocarpin	Ringer	Pilocarpin	Ringer	Pilocarpin	Ringer	
22. VII.	2,78	1,57	5,32	5,53	32,1	17,2	1,71	0,95	96′
13. IX.	3,66	1,43	4,55	3,55	44,8	21,4	2,04	0,76	90
27. IX.	—	—	3,67	2,86	43,0	16,6	1,58	0,48	81
28. IX.	3,44	2,31	4,49	5,36	30,0	16,2	1,34	0,86	89
30. IX.	3,21	2,01	5,81	5,74	40,5	15,0	2,36	0,86	85
1927 7. I.	2,31	1,63	5,51	4,61	38,0	9,5	2,10	0,44	28
Mittelwert:	3,08	1,79	4,89	4,61	38,1	16,0	1,86	0,73	

Die angewendete Pilocarpindosis betrug stets 0,4 mg Pilocarpin. hydrochlor. auf 100 ccm Ringerlösung. Wiederum zeigt die Übereinstimmung der Mittelwerte des D. W. bei der normalen und bei der Pilocarpindrüse, daß keine Neubildung von Diastase unter Pilocarpinwirkung stattgefunden hat. *Dagegen wird V_{O_2} durch Pilocarpin auf beinahe das Doppelte erhöht.* Es wird interessant sein, zu versuchen, ob sich der Mechanismus, durch den die Steigerung der V_{O_2} durch Pilocarpin bewirkt wird, wird klarstellen lassen. Es darf vielleicht daran

erinnert werden, daß *Anrep* und *Cannan*[1]) an der Submaxillaris des Hundes nach Pilocarpingabe ein verstärktes Abwandern des Zuckers aus dem Blute in die Drüse gefunden haben. D. W. $A._{100}$ und D. W. $A._{100}$ Proz. sind in allen Versuchen bei der Pilocarpindrüse stark gesteigert, doch ist die Steigerung der Mittelwerte geringer als bei der Beeinflussung durch Adrenalin. Der zeitliche Verlauf des D. W. A. wurde in dem Versuch am 7. Januar 1927 verfolgt. Es ergab sich dabei für die unbeeinflußte Kontrolldrüse D. W. zu 4,61, D. W. $A._{100}$ zu 0,44 und D. W. $A._{100}$ Proz. zu 9,5 bei einer Versuchsdauer von 105 Minuten. Die Pilocarpindrüse kam zunächst für 28 Minuten in Pilocarpin-Ringer, es trat 0,59 Diastase aus pro 100 mg Drüse. In Periode II (reine Ringerlösung), die 37 Minuten dauerte, traten 0,51, in Periode III (37 Minuten, wieder reine Ringerlösung) traten 0,37 Diastase aus. D. W. I. betrug am Schluß des Versuchs 4,04, demnach ist D. W. = 4,04 + 0,59 + 0,51 + 0,37 = 5,51.

In Periode 1 ist D.W.I. = D.W. = 5,51, D.W.$A._{100}$ = 2,1 in Prozenten vom D.W.I. 38 Proz.

In Periode 2 ist D.W.I. = 5,51 − 0,59 = 4,92, D.W.$A._{100}$ = 1,38, in Prozenten vom D.W.I. 28 Proz.

In Periode 3 ist D.W.I. = 4,92 − 0,51 = 4,41, D.W.$A._{100}$ = 1,00, in Prozenten vom D.W.I. 22,5 Proz.

Der zeitliche Verlauf des Diastaseaustritts entspricht dem beim Adrenalinversuch gefundenen. Wiederum sinkt D. W. A., in Prozenten vom D. W. I. ausgedrückt, dauernd ab. Wiederum ist dies Absinken steiler als in den Normalversuchen. Wiederum ist der Wert, der in Periode III erhalten wird, etwa halb so groß wie in Periode I. Dabei ist aber wiederum D. W. A. in Periode III immer noch über doppelt so groß wie bei der unbeeinflußten Drüse. Die betreffenden Werte sind 1,00 und 0,44.

Es entsteht die Frage, wie kommt die „Bindung" des nicht diffusiblen Anteils der Diastase in der Zelle zustande? Es lag nahe, hier die früher von *Zipf* und mir[2]) für die Leberdiastase erhobenen Befunde heranzuziehen und die Frage zu prüfen, ob das Austreten der Diastase aus der Drüse durch Propyl-, Butyl- und Amylalkohol in isokapillarer Konzentration beeinflußbar sei.

Tabelle X gibt die Versuche mit Propylalkohol wieder. Die Propylalkoholkonzentration ist in diesen Versuchen nicht genau bekannt. Es wurde soviel Propylalkohol (etwa 4 ccm) zu 100 ccm Ringerlösung zugesetzt, daß die Tropfenzahl, im Stalagmometer nach *Traube* be-

---

[1]) Journ. of phys. **56**, 248, 1922.

[2]) *Lesser* und *Zipf*, diese Zeitschr. **140**, 439, 1923; *Lesser*, ebendaselbst **156**, 161, 1925; **171**, 83, 1926.

Tabelle X.

Propylalkoholversuche.

Datum 1926	V_{O_2}		D. W.		D. W. A.$_{100}$ Proz.		D. W. A.$_{100}$		Dauer der Einwirkung
	Propylalkohol	Ringer	Propylalkohol	Ringer	Propylalkohol	Ringer	Propylalkohol	Ringer	
14. VII.	2,18	1,82	4,48	4,48	52	11	2,35	0,50	88′
1. X.	1,82	1,79	7,59	7,99	17,4	13,2	1,32	1,06	89
15. X.	1,57	1,01	8,61	9,17	37	18,6	3,2	1,70	92
16. XI.	2,07	2,12	4,55	5,90	42	14,8	1,92	0,87	78
19. XI.	1,81	1,72	5,49	4,66	48	21,5	2,65	1,00	38
29. XI.	1,43	1,15	4,32	4,23	40	12,6	1,72	0,53	36
8. XII.	2,11	2,18	6,12	5,58	29	11,5	1,80	0,64	38
10. XII.	2,22	1,82	6,07	5,45	19	7,5	1,15	0,41	40
Mittelwert:	1,90	1,71	5,90	5,93	35,5	13,8	2,01	0,84	

stimmt, im Verhältnis von 144 zu 100 anwuchs. Von dieser Lösung wurden zum Versuch 0,5 ccm benutzt. Über diese wurde 4 Minuten lang ein starker Sauerstoffstrom nach Erwärmen auf 38^0 geleitet, wodurch eine unbekannte Alkoholmenge verdunstete. Außerdem mußte sich der zwischen 3,5 und 4,5 ccm betragende gashaltige Raum der Versuchsgefäße mit Alkoholdampf sättigen. Endlich nahm die Drüse, die etwa drei Gewichtsprozent der angewandten Lösungsmenge betrug, eine gewisse Alkoholmenge aus der Lösung auf. Die Konzentration an Propylalkohol in der Außenflüssigkeit war daher stets *kleiner* als einer Erhöhung der Tropfenzahl im Verhältnis 144 zu 100 entsprach. *Die so erhaltene Alkoholkonzentration setzt V_{O_2} noch nicht herab.* Daraus darf man wohl schließen, daß das erhaltene Ergebnis nicht auf eine „Zellschädigung" zu beziehen ist, mit anderen Worten, daß nicht unter irreversiblen Bedingungen gearbeitet wurde. Ebensowenig wie V_{O_2} wurde D. W. beeinflußt. *D. W. A.$_{100}$ Proz. und D. W. A.$_{100}$ zeigen dagegen Steigerungen von ähnlicher Größenordnung wie bei der Beeinflussung durch Adrenalin oder Pilocarpin.*

Ein weiteres wichtiges Kriterium dafür, wieweit der Versuch unter reversiblen Bedingungen vor sich geht, bildet der zeitliche Verlauf des Austritts von Diastase aus der Drüse. Drei Versuche, in denen der zeitliche Verlauf bei kürzerer Propylalkoholeinwirkung (36 bis 40 Minuten) ermittelt wurde, zeigt die Tabelle XI.

Der zeitliche Verlauf ist hier genau derselbe wie bei den Versuchen mit Adrenalin und Pilocarpin. Werden die in den drei aufeinanderfolgenden Perioden austretenden Diastasemengen auf gleiche Versuchsdauer (100 Minuten) reduziert und in Prozenten der am Anfang jeder Periode noch in der Drüse vorhandenen Diastasemenge ausgedrückt, so sinkt der so erhaltene Wert dauernd ab. Er beträgt für

Tabelle XI.

Zeitlicher Verlauf der Propylalkoholversuche.

Datum	Periode I			Periode II			Periode III		
	D. W. I	D. W. A.$_{100}$	D. W. A.$_{100}$ in Proz. von D. W. I.	D. W. I.	D. W. A.$_{100}$	D. W. A.$_{100}$ in Proz. von D. W. I.	D. W. I.	D. W. A.$_{100}$	D. W. A.$_{100}$ in Proz. von D. W. I.
29. XI.	4,32	2,7	64	3,35	1,5	45	2,82	0,94	33
8. XII.	6,12	3,3	54	4,86	1,6	33	4,27	0,74	27
10. XII.	6,07	1,25	20,6	4,82	1,4	29	4,53	0,78	17
Mittelwerte:	—	2,4	46	—	1,5	36	—	0,82	26

Periode III etwas über die Hälfte des Wertes von Periode I. D. W. A.$_{100}$ ist in Periode III aber immer noch beträchtlich höher als D. W. A.$_{100}$ der Kontrolldrüse. Die Mittelwerte für D. W. A.$_{100}$ betragen 0,53 für die Kontrolldrüse und 0,82 für die Propylalkoholdrüse.

Die mit Butylalkohol erhaltenen Werte sind in Tabelle XII zusammengestellt. Die . angewendeten Butylalkoholmengen betragen zwischen 1,2 und 1,4 ccm Butylalkohol auf 100 ccm Ringerlösung. Die Tropfenzahl der Lösungen wurde durch den Alkoholzusatz im Verhältnis von 140 bis 150 zu 100 gesteigert. Die genaue Alkoholkonzentration im Versuch ist auch hier aus den gleichen Gründen wie beim Prpoylalkohol unbekannt. Doch handelt es sich um eine etwa isokapillare Konzentration, nicht um eine isomolare. Eine isomolare Konzentration würde etwa die vierfache Menge (rund 5 ccm) an Butylalkohol auf 100 ccm Ringerlösung enthalten haben.

Tabelle XII.

Butylalkoholversuche.

Datum 1926	VO_2		D. W.		D. W. A.$_{100}$ Proz.		D. W. A.$_{100}$		Einwirkungszeit
	Butylalkohol	Ringer	Butylalkohol	Ringer	Butylalkohol	Ringer	Butylalkohol	Ringer	
22. X.	1,42	1,66	4,23	4,57	29,5	11,6	1,25	0,54	93′
15. XII.	1,70	2,26	5,00	4,94	21,4	10,3	1,07	0,51	40
17. XII.	1,64	1,60	5,11	5,71	22,0	9,3	1,13	0,53	20
20. XII.	1,92	1,72	3,94	4,09	18,1	9,3	0,71	0,39	20
30. XII.	1,88	1,80	6,30	5,83	26,5	18,6	1,67	1,08	25
1927 3. I.	1,77	1,86	3,64	4,32	25,0	13,4	0,91	0,58	27
Mittelwerte:	1,76	1,82	4,70	4,91	23,8	12,1	1,12	0,61	

Man sieht aus der Tabelle XII, daß die angewendeten Butylalkoholkonzentrationen auch hier so gewählt waren, daß noch keine Atmungshemmung eintrat, so daß wiederum eine irreversible Schädigung

der Zellen nicht eingetreten sein kann. Ferner erkennt man aus den drei ersten Versuchen, die unter recht ähnlichen Bedingungen angestellt waren (D. W. A.$_{100}$ und D. W. A.$_{100}$ Proz. sind bei den drei Kontrolldrüsen fast dieselben), daß die Dauer der Alkoholeinwirkung keine Rolle spielt. Obwohl in dem Versuch vom 17. Dezember die Einwirkungsdauer weniger als ein Viertel der im Versuch vom 22. Oktober benutzten betrug, ist D.W.A.$_{100}$ und D.W. A.$_{100}$ Proz. bei beiden von ungefähr gleicher Größenordnung. Dabei ist zu berücksichtigen, daß D. W. A.$_{100}$ hier stets unter Zugrundelegung der *ganzen* Versuchsdauer berechnet worden ist, nicht nur aus der ersten Periode *der* Versuche, in denen der zeitliche Verlauf von D. W. A.$_{100}$ bestimmt wurde. Die Tabelle XII liefert im übrigen das von den Adrenalin-, Pilocarpin- und Propylalkoholversuchen bereits bekannte Bild. Keine Änderung vom D. W. und V_{O_2}, Steigerung von D. W. A.$_{100}$ und D. W. A.$_{100}$ Proz. auf beinahe das Doppelte. Dasselbe gilt für Tabelle XIII, welche den zeitlichen Verlauf darstellt. Eine

Tabelle XIII.

Zeitlicher Verlauf der Butylalkoholversuche.

Datum	Periode I			Periode II			Periode III		
1926	D. W. I.	D. W. A.$_{100}$	D. W. A.$_{100}$ in Proz. von D. W. I.	D. W. I.	D. W. A.$_{100}$	D. W. A.$_{100}$ in Proz. von D. W. I.	D. W. I.	D. W. A.$_{100}$	D. W. A.$_{100}$ in Proz. von D. W. I.
15. XII.	5,00	1,3	26	4,47	1,05	23,5	4,07	0,81	19,8
17. XII.	5,11	1,3	25	4,74	1,37	29,0	4,39	0,83	18,8
20. XII.	3,94	1,05	27	3,73	0,84	22,5	3,42	0,42	12,2
30. XII.	6,30	2,2	35	5,75	1,8	31	5.08	1,2	23,6
1927 3. I.	3,64	1,48	41	3,24	0.97	30	2,88	0,70	24
Mittelwerte:	—	1,47	31	—	1,26	27,2	—	0,79	19,7

Differenz gegenüber den bisher mitgeteilten Versuchen besteht nur insofern, als die Steigerung von D. W. A.$_{100}$ (Tabelle XII) etwas geringer ausfällt als beim Propylalkohol und das Absinken der in Prozenten vom D. W. I. ausgedrückten D. W. A.$_{100}$ mit der Zeit in den Butylalkoholversuchen etwas weniger steil ist. Dies liegt wohl daran, daß die verwendeten Alkohollösungen nicht genau isokapillar waren. Eine Wiederholung der Versuche unter Messung der Oberflächenspannung oder der Alkoholkonzentration in der Ringerlösung *nach Schluß* des Versuchs wäre zur Entscheidung der Frage wünschenswert. Allerdings setzt sie ein Verfahren voraus, mit dem man in 0,5 ccm Lösung sehr rasch eine Messung der Oberflächenspannung vornehmen kann.

Einige Versuche mit Amylalkohol sind in den Tabellen XIV und XV mitgeteilt.

Tabelle XIV.

Amylalkoholversuche.

Datum 1926	V_{O_2} Amylalkohol	V_{O_2} normal	D. W. Amylalkohol	D. W. normal	D. W. A.$_{100}$ Proz Amylalkohol	D. W. A.$_{100}$ Proz normal	D. W. A.$_{100}$ Amylalkohol	D. W. A.$_{100}$ normal	Einwirkungszeit
27. X.	1,30	1,87	5,74	5,47	33,8	18,2	1,94	1,0	94′
1927 14. II.	1,60	1,59	5,51	5,51	20,7	9,6	1,14	0,53	43
15. II.	1,25	1,56	5,93	5,64	26,5	8,3	1,57	0,47	43
Mittelwerte:	1,38	1,67	5,76	5,54	27	12	1,55	0,67	

Tabelle XV.

Zeitlicher Verlauf der Amylalkoholversuche.

Datum 1927	Periode I D. W. I	Periode I D. W. A.$_{100}$	Periode I D. W. A.$_{100}$ in Proz. von D. W. I.	Periode II D. W. I.	Periode II D. W. A.$_{100}$	Periode II D. W. A.$_{100}$ in Proz. von D. W. I.	Periode III D. W. I.	Periode III D. W. A.$_{100}$	Periode III D. W. A.$_{100}$ in Proz. von D. W. I.
10. II.	3,18	0,88	27,5	2,81	0,70	24,8	2,70	0,31	11,5
14. II.	5,51	1,53	27,5	4,85	1,44	29,6	4,27	0,44	10,3
15. II.	5,93	1,81	30,5	5,15	1,85	36,0	4,41	1,02	23,0
Mittelwerte:	—	1,41	28,5	—	1,33	30,1	—	0,59	14,9

Die Amylalkoholkonzentration war wiederum so gewählt, daß eine ungefähr isokapillare Lösung entstand. In 100 ccm Ringerlösung waren 0,44 bis 0,56 ccm Amylalkohol enthalten. Die Tropfenzahl erhöhte sich dadurch gegenüber Wasser im Verhältnis von 144 bis 152 : 100. Eine Lösung, welche die gleiche Anzahl Mole, wie die verwendete Propylalkohollösung enthalten hätte, würde in 100 ccm Lösung 11,7 ccm Amylalkohol enthalten haben. Die im eigentlichen Versuch vorhandene Alkoholkonzentration ist auch hier um einen unbekannten Wert kleiner als den angegebenen Tropfenzahlen entspricht. In zwei von den drei Versuchen ist eine Hemmung der V_{O_2} durch den Amylalkohol eingetreten, die wohl außerhalb der Versuchsfehler liegt (30,5 und 20 Proz. Erniedrigung). In dem Versuch vom 15. Februar 1927 konnte aber, da hier die Beeinflussung nur während des ersten Drittels der Versuchsdauer stattfand, festgestellt werden, daß diese Hemmung *vollkommen reversibel* war. Ebenso zeigt der zeitliche Verlauf des Austritts von Diastase, daß es sich nicht um eine irreversible Beeinflussung gehandelt hat. In den beiden Februarversuchen sinkt in der zweiten Periode der in Prozenten vom D. W. I. gemessene Diastaseaustritt noch nicht, steigt vielmehr noch etwas an, indessen kommt dies auch sonst gelegentlich vor, z. B. im Butylalkoholversuch vom 17. Dezember

in Tabelle XIII und im Propylalkoholversuch vom 10. Dezember in Tabelle XI. Dementsprechend ist das Absinken von D. W. $A._{100}$ in Prozenten vom D. W. I. ausgedrückt, von Periode II zu Periode III um so beträchtlicher. Im übrigen geben die Versuche mit Amylalkohol genau dasselbe Bild wie diejenigen mit Butyl- und Propylalkohol von ungefähr isokapillarer Konzentration.

Tabelle XVI.

Versuchsart	D. W.		D. W. $A._{100}$ Proz.		D. W. $A._{100}$		Zeitlicher Verlauf D. W. $A._{100}$ in Proz. von D. W. I.		
	beeinflußt	normal	beeinflußt	normal	beeinflußt	normal	Periode I	Periode II	Periode III
Normal . . .	3,08	3,27	14,6	14,9	0,45	0,49	20	17	14,7
Adrenalin . .	4,65	4,94	55,3	14,2	2,36	0,67	67	37	34
Pilocarpin . .	4,89	4,61	38,1	16,0	1,86	0,73	38	28	22,5
Propylalkohol	5,90	5,93	35,5	13,8	2,01	0,84	46	36	26
Butylalkohol .	4,70	4,91	23,8	12,1	1,12	0,61	31	27	19,7
Amylalkohol .	5,76	5,54	27	12	1,55	0,67	29	30	15

In Tabelle XVI habe ich die Mittelwerte aus allen Versuchen noch einmal nebeneinander gestellt. *Man sieht, daß D. W. $A._{100}$ und D. W. $A._{100}$ Proz. in allen Versuchsreihen bei den unbeeinflußten Drüsen nur kleine Schwankungen aufweisen* (zwischen 0,49 und 0,84 und zwischen 12 und 16 Proz.). *Dagegen sind die Erhöhungen von D. W. $A._{100}$ und D. W. $A._{100}$ Proz. bei den beeinflußten Drüsen in allen Versuchsreihen sehr beträchtlich und für Pilocarpin und die verschiedenen Alkohole von ungefähr gleicher Größenordnung.* Am niedrigsten ist die Steigerung beim Butylalkohol (199 Proz.), am höchsten beim Propylalkohol (256 Proz.), dazwischen liegen Pilocarpin (239 Proz.) und Amylalkohol (225 Proz.). Die Differenzen zwischen den verschiedenen Alkoholen beruhen wohl darauf, daß sie nicht in genau isokapillarer Konzentration zur Einwirkung kamen. Beträchtlich höher ist dagegen die Steigerung durch Adrenalin (390 Proz.).

Der Vorgang des Austretens von Diastase ist mit den energieliefernden Prozessen in der Zelle wahrscheinlich nicht direkt verbunden. Der Diastaseaustritt kann gesteigert sein bei steigender (Pilocarpin), gleichbleibender (Adrenalin, Propyl-, Butylalkohol) und leicht gesenkter V_{O_2} (Amylalkohol). Es ist also wahrscheinlich ein Vorgang, der *keine* Energiezufuhr verlangt. Da nun V_{O_2} bei der Drüse im Tierkörper stets erheblich bei der Sekretionstätigkeit steigt, muß man wohl annehmen, daß *der* Vorgang, der unter Steigerung des energieliefernden Prozesses abläuft, die Sekretion von Wasser und von Salzen ist. Die weitere Untersuchung der Pilocarpinwirkung an der ausgeschnittenen Drüse kann vielleicht entscheiden, wieweit diese Anschauung richtig ist.

Daraus, daß die verschiedenen Alkohole in iso*kapillarer* und nicht in iso*molarer* Konzentration wirken, muß nach dem Vorgange *L. Traubes*[1]) und *O. Warburgs*[2]) der Schluß gezogen werden, daß es sich um eine Beeinflussung von Grenzflächen handelt. Es könnte sich um die Grenzfläche der Zelle gegen außen, d. h. um die sogenannte Zellmembran handeln. Dagegen spricht aber der zeitliche Verlauf der Steigerung des Austritts von Diastase, welche die Periode der Einwirkung der Pharmaka erheblich überdauert. Der zeitliche Verlauf der unter reversiblen Bedingungen angestellten Versuche mit Beeinflussung durch Sekretionsgifte ist derselbe wie bei normalen, unbeeinflußten Drüsen, und nur erklärbar, wenn angenommen wird, daß die Diastase in zwei Formen in der Drüsenzelle vorhanden ist, nämlich als diffusible, im Zellsaft gelöste Diastase, und als „gebundene" Diastase. Bei der Tötung des Tieres ist oder wird eine gewisse Menge Diastase diffusibel, die mehr als 15 Proz. der gesamten Diastasemenge beträgt. Diese geht, allmählich immer langsamer, entsprechend ihrer abnehmenden Menge, aus der Zelle heraus. Die benutzten Beeinflussungen, und zwar sowohl die „spezifischen" Sekretionsgifte Pilocarpin und Adrenalin, wie die oberflächenaktiven Alkohole, vermehren die Menge der diffusiblen Diastase auf Kosten der gebundenen. Der Austritt der diffusiblen Diastase erfolgt dann, auch wenn die Einwirkung des Pharmakons längst aufgehört hat, in derselben Weise, wie der Austritt von Diastase aus der unbeeinflußten Drüse. Daraus ergibt sich, daß einmal diffusibel gewordene Diastase entweder gar nicht oder nur zu einem Teil wieder „gebunden" wird.

Diese Bindung wird durch das Eindringen oberflächenaktiver homologer Alkohole von isokapillarer Konzentration in die Zelle gelöst. Daher handelt es sich um Verdrängung von Diastase aus einer Adsorption an Grenzflächen der Zellstruktur, die auch als „Freilegung" der Diastase bezeichnet werden kann.

Es scheint mir von höchster Bedeutung, daß sämtliche Stoffe, welche in der Parotis der weißen Maus Diastase freilegen, an der Leber zuckertreibend wirken. Für das Adrenalin und oberflächenaktive, isokapillare Alkohole ist dies unter reversiblen Bedingungen von *Zipf* und mir gezeigt worden, nachdem bereits vorher die Adrenalinwirkung an der herausgeschnittenen Säugetierleber von *Iwanoff*[3]) und *Masing*[4]), an der Froschleber von *Bang*[5]) und *Fröhlich* und *Pollack*[6]) gezeigt war.

---

[1]) *L. Traube*, Pflügers Arch. **153**, 276, 1913.
[2]) *O. Warburg*, Jahresber. ü. d. ges. Phys. u. Pharm. **1**, 136, 1923.
[3]) Iwanoff, Centralbl. f. Physiol. **19**, 891, 1905.
[4]) *Masing*, Schmiedebergs Arch. **69**, 431, 1912.
[5]) *Bang*, diese Zeitschr. **49**, 1 und 81, 1913.
[6]) *Fröhlich* und *Pollak*, Schmiedebergs Arch. **77**, 265, 1914.

Für das Pilocarpin ist die zuckertreibende Wirkung, die durch Hydrolyse des Glykogens durch die Leberdiastase verursacht wird, durch *Bornstein* und *Vogel*[1]), sowie durch *Hornemann*[2]) nachgewiesen worden. Wir haben den Vorgang, d. h. die zuckertreibende Wirkung dieser Pharmaka, früher als Freilegung der Leberdiastase aus einer reversiblen Adsorptionsbindung an die Zellstruktur erklärt. Wir finden ihn an der Parotis der weißen Maus vollkommen wieder und stehen daher nicht an, den Übergang der Diastase aus der Speicheldrüse in den abgesonderten Speichel auf die vorherige Freilegung der Diastase aus ihrer Adsorptionsbindung in der Zelle zurückzuführen. *Ich glaube hiermit den wesentlichen Punkt bei der Sekretion der Verdauungsfermente klargestellt zu haben.* Denn mit der hier befolgten Methodik wird es hoffentlich möglich sein, auch die Pepsinsekretion bei der Magenwand der weißen Maus, oder die Invertinsekretion beim Dünndarm, vielleicht auch die Trypsinsekretion beim Pankreas an der herausgeschnittenen Drüse quantitativ messend zu verfolgen und zu beeinflussen.

Eine Differenz besteht zwischen Leber und Speicheldrüse insofern, als die freigelegte Diastase aus der Leberzelle nicht austritt[3]). Dies liegt wohl daran, daß sie bei der Winterleber des Frosches unterwegs auf große Glykogenmengen trifft, welche sie in der Zelle festhalten. Vielleicht beruht hierauf auch die Reversibilität der Freilegung der Leberdiastase, welche bei der Parotis ganz oder teilweise zu fehlen scheint.

Die Frage, ob das Adrenalin und das Pilocarpin an der Zelle direkt angreifen oder an nervösen Endapparaten des Sympathicus und Parasympathicus, kann durch diese Versuche nicht entschieden werden. Wenn diese Pharmaka an nervösen Endapparaten angreifen, so würde deren Erregung zu einer Verkleinerung der diastaseadsorbierenden Grenzflächen führen und so Diastase aus der Adsorption verdrängen. Es ist früher[4]) darauf hingewiesen worden, daß eine solche Vorstellung den Mechanismus erklären würde, durch welchen chemische Geschwindigkeiten in der Zelle vom Nerven aus beeinflußbar sind.

Es ist vielleicht erlaubt, darauf hinzuweisen, daß die Durchführung dieser Arbeit nur möglich war durch die Angabe einer Mikromethode zur Messung der Gewebsatmung durch *O. Warburg* und einer Diastaseschnellmethode durch *P. Rona* und *C. van Eweyk*. *O. Warburg* sagte in seiner ersten Abhandlung (a. a. O., S. 327), daß seine Methode derart sei, „daß man das Verfahren überall da benutzen könne, wo die

[1]) *Bornstein* und *Vogel*, diese Zeitschr. **122**, 274, 1921.
[2]) *Hornemann*, ebendaselbst **122**, 269, 1921.
[3]) *Lesser*, ebendaselbst **102**, 304, 1920.
[4]) *Derselbe*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 27.

Durchblutungsmethode aus irgend einem Grunde nicht verwendbar sei". Ich glaube, die vorliegende Arbeit zeigt, daß diese Voraussagung *O. Warburgs* so zutreffend wie möglich gewesen ist. Ebenso bestätigt diese Mitteilung auch die letzten Sätze der Arbeit von *P. Rona* und *C. van Eweyk*, in denen diese Autoren von ihrer Methode (a. a. O., S. 187) sagen: „Die Durchführung der Messungen ist erheblich einfacher als die Vornahme von Zuckerbestimmungen; es ist ohne weiteres möglich, selbst größere Versuchsreihen ohne Schwierigkeit aufzuarbeiten".

Der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft danke ich für die Überlassung eines Nephelometers, Herrn *E. Bissinger* für die sorgfältige Ausführung der zahlreichen stalagmometrischen Bestimmungen.

II. Zur Methodik.

1. Präparation und Wägung der Drüsen.

Benutzt wurden nur männliche, weiße Mäuse eigener Zucht, die zwischen 20 und 25 g wogen. Die Vorbehandlung war die gleiche wie früher beschrieben[1]). Die Tiere waren mit Brot und Milch gefüttert. Eine Hungerperiode ging dem Versuch nicht voran. Die Tiere wurden durch Entbluten aus den großen Abdominalgefäßen getötet, mit dem Bauche nach oben aufgespannt, die Haut von der Schnauzenspitze bis zur Mitte des Sternums gespalten, der Schnitt über die Mitte der vorderen Extremitäten bis zu deren Ende fortgeführt und die Haut vorsichtig nach der Seite zurückpräpariert. Die Drüse liegt, wie aus der Abb. 1 zu ersehen, an dem häutigen Gehörgang angewachsen. Die Herauspräparierung aus dem die Drüse begrenzenden Fettgewebe ist nicht ganz leicht und gelang mir erst nach einiger Übung. Auch dann ist man nie sicher, einerseits nur Drüsengewebe zu haben, andererseits die Drüse vollständig herauspräpariert zu haben. Ich habe lieber eher Drüsengewebe im Tiere belassen als Fettgewebe mitgenommen. Das beste Kriterium für gute Präparation ist die Übereinstimmung des Gewichts zwischen rechter und linker Drüse. Gewogen habe ich auf 0,2 mg, d. h. bei 10 mg Gewicht 2 Proz. Fehler. Eine Mikrowage stand mir nicht zur Verfügung. Da aber die Präparation kein reines Drüsengewebe liefert, da ferner eine verschiedene Füllung der Blutgefäße Gewichtsdifferenzen von einigen Gewichtsprozent bedingen kann, wird man bei Benutzung einer Mikrowage zwar die Zeit, die zwischen Tod des Tieres und Beginn des Versuchs verstreicht, verlängern, den Fehler aber kaum wesentlich verringern können. Eine Bestimmung der Trockensubstanz der Drüsen am Schluß des Versuchs war dadurch unmöglich gemacht, daß die Drüsen verrieben werden mußten, um D. W. zu ermitteln. Von der Tötung des Tieres bis zum Versuchsbeginn vergingen 12 bis 16 Minuten, d. h. spätestens 16 Minuten nach Tötung des Tieres befanden sich beide Drüsen im Wasserbad bei 38° in Sauerstoffatmosphäre. Es wurde stets zuerst die rechte Drüse präpariert, was 4 bis 6 Minuten dauerte; dabei wurde nur die Haut auf der rechten Seite abgezogen. Die linke Drüse blieb also unterdessen in situ im Fettgewebe in vollkommen natürlicher Lage, so daß ein Gewichtsverlust durch Verdunstung ausgeschlossen war. Die Präparation der linken Drüse war 4 bis 6 Minuten später beendet

---

[1]) *Bissinger* und *Lesser*, diese Zeitschr. **168**, 398, 1926.

als die der rechten. Die linke Drüse war also 4 bis 6 Minuten länger der Zirkulation und damit der Sauerstoffversorgung entzogen. Außerdem blieb sie 4 bis 6 Minuten länger bei einer Temperatur, die unter der physiologischen lag. Eine Beeinflussung der V_{O_2} oder des D. W. A. wurde dadurch nicht bewirkt, wenigstens keine solche, welche die Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode überschritten hätte.

2. *Bestimmung von* V_{O_2}.

Zur Bestimmung von V_{O_2} wählte ich die erste *Warburg*sche Methode, die „Trog"- und nicht die „Kästchenmethode"[1]. Die Trogmethode arbeitet in CO_2-freier Atmosphäre, also unter nicht vollkommen physiologischen Bedingungen. Die Kästchenmethode verlangt Doppelbestimmungen in stark verschiedenen Mengen Ringerlösung, ferner genau bekannte Gewichtsmengen zweier Gewebsstücke von gleicher Beschaffenheit und gleicher Sauerstoffzehrung. Da ich die Gewichtsmengen nicht genau genug bestimmen konnte, Trockensubstanzbestimmungen nicht möglich waren, eine genau gleiche Sauerstoffzehrung der rechten und linken Drüse nicht vorausgesetzt werden durfte — es zeigte sich dann, daß sie innerhalb der Fehlergrenzen meiner Methodik übereinstimmten —, so habe ich mich vorläufig auf die „Trog"methode beschränken müssen, hoffe aber, die Versuche bald mit der „Kästchen"methode wiederholen zu können. Dazu wird es nötig sein, zu untersuchen, ob bei stark verschiedenen Mengen der Ringerlösung, in der die Drüsen suspendiert sind, D. W. $A._{100}$ Proz. gleich bleibt, was zwar wahrscheinlich ist, aber natürlich nicht vorausgesetzt werden darf. Die Ringerlösung war stets frisch bereitet nach der *Warburg*schen Angabe aus isotonischen Lösungen, wie ich mich auch sonst bemüht habe, die von *Warburg* gegebenen Vorschriften möglichst genau zu befolgen. Die Bicarbonatlösung wurde stets frisch hergestellt. Der Ringerlösung wurden dann stets etwa 0,2proz. Glucose zugesetzt. Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt. Die Tröge wurden stets nach dem Versuch mit Chromsäure-Schwefelsäure gereinigt, gründlich mit Leitungswasser, dann mit doppelt destilliertem Wasser gespült. Endlich bei 160° im Trockenschrank für eine Stunde getrocknet. Die Bestimmung des Volumens der Tröge geschah nach *Warburg-Rona*[2]. Doppelbestimmungen, die in Zwischenräumen von mehreren Monaten vorgenommen wurden, ergaben Differenzen von 0,1, 0,27, 0,4, 0,45 und 1,1 Proz. Bei den Versuchen, bei denen der zeitliche Verlauf von D. W. A. bestimmt werden sollte, wurde die eine Drüse, nachdem 20 bis 40 Minuten in Ringerlösung bei 38° geschüttelt war, aus dem Trog 1 herausgenommen, sofort in Trog 2 gebracht, der möglichst rasch an das Manometer angesetzt wurde. Nachdem die Verbindung zur Sauerstoffbombe hergestellt war und die Sauerstoffdurchleitung begonnen hatte, wurde der Trog zu drei Viertel seines Volumens in das Wasserbad getaucht und unter langsamem Schütteln 3 bis 4 Minuten Sauerstoff durchgeleitet. Dann nach Lösung der Verbindung mit der Bombe der Stopfen eingedreht und der Trog in die andere zum Versuch benutzte Schüttelvorrichtung gebracht und 15 Minuten bei offenem Hahn geschüttelt, dann wieder die Messung der Atmung begonnen. Dabei fanden sich in zehn Normalversuchen

[1]) *Warburg*, ebendaselbst **152**, 51, 1924.

[2]) *Rona*, Prakt. d. phys. Chem. I. Fermentmethoden, S. 107. Berlin, Julius Springer, 1926.

Differenzen in der ersten und zweiten Versuchsperiode von 0 bis 7,6 Proz., im Mittel 3,6 Proz. Zu diesen Fehlern würden sich die Wägefehler von 4 Proz. addieren, wodurch sich die bei Normalversuchen (s. Teil I, Tabelle IV) gefundenen Differenzen zwischen der rechten und linken Drüse zum größten Teile erklären. Größere Differenzen bei unbeeinflußten Drüsen hängen wohl mit bei der Präparation der Drüse begangenen Fehlern zusammen.

3. *Bestimmung von D. W.*

Die Bestimmungen von D. W. und D. W. A. geschahen nach den Angaben von *Rona* und *van Eweyk*, die so genau wie möglich befolgt wurden, insbesondere bezüglich Herstellung und Prüfung des verwendeten Glykogens. In der Ausführung der nephelometrischen Bestimmungen folgte ich den detaillierten Angaben von *Kleinmann*[1]). Abgewichen bin ich von den Angaben von *Rona* und *van Eweyk* nur im folgenden. Um Glykogen zu sparen, wurden stets nicht 100, sondern nur 50 ccm 0,3proz. Glykogenlösung verwendet. Das Glykogen wurde nicht in Wasser, sondern in Phosphat-Kochsalzgemisch ($p_H = 6,8$) gelöst. Dieses enthielt im Liter stets 75 ccm saure und 75 ccm alkalische Phosphatlösung nach *Sörensen* und 10 ccm 0,9proz. Kochsalzlösung. Zu je 50 ccm Glykogen-Phosphat-NaCl kamen immer 5 ccm Fermentlösung, so daß das Gesamtvolumen immer 55 ccm betrug. Anfänglich wurde der Wert von K stets durch drei Messungen ermittelt. Im Mittel aus 55 Bestimmungen betrug dabei der Fehler 2,3 Proz. In den späteren Versuchen wurde der Wert von K — da es nötig war, an einem Nachmittag sechs verschiedene Diastasebestimmungen zu machen — nur einmal ermittelt; dabei war die Übereinstimmung zwischen D. W. rechts und links nicht schlechter als vorher, denn die Fehler der Diastasebestimmungsmethode sind kleiner als die Wäge- und Präparationsfehler.

Die Drüsen wurden stets nach Verreiben mit dem oben beschriebenen Phosphat-Kochsalzgemisch auf 10 ccm im Meßkölbchen aufgefüllt. Dabei resultierte eine opalisierende Lösung, in der einige Bindegewebsfetzen schwammen. Die Lösung wurde filtriert durch trockenes Filter, sie wurde dabei aber nicht klarer; auch durch Zentrifugieren wurde sie nicht klar. Von der Lösung wurden dann 1 bis 2 ccm auf 50 ccm mit doppeltdestilliertem Wasser aufgefüllt, davon kamen dann 5 ccm zum Fermentversuch. Da Verreiben der Drüsen mit Quarzsand dasselbe Resultat wie Verreiben ohne Quarzsand lieferte, wurde zum Verreiben kein Quarzsand benutzt. Die Ringerlösung, in der die Drüsen geatmet hatten, wurde ebenfalls mit Phosphat-Kochsalzgemisch auf 10 ccm im Meßkölbchen aufgefüllt. Diese Lösung war klar. 4 bis 7 ccm davon wurden unfiltriert mit doppeltdestilliertem Wasser auf 50 ccm aufgefüllt und 5 ccm dieser Lösung zur Fermentbestimmung verwendet.

Stets wurden alle Fermentversuche mit der gleichen Glykogenlösung angestellt. Stets wurden alle Messungen am gleichen Tage innerhalb von 6 Stunden vorgenommen. Der ganze Versuch war stets 9 Stunden nach dem Tode des Tieres beendet.

---

[1]) *A. Kleinmann*, diese Zeitschr. **99**, 115, 1919; **137**, 144, 1923.

Zersetzung von Leuchtgas und Kohlenoxyd durch Bakterien.

Von

Walther Hasemann.

(Aus dem Bakteriologisch-chemischen Laboratorium der Technischen Hochschule Hannover.)

(Eingegangen am 27. Februar 1927.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Inhaltsübersicht.

I. Einleitung und Fragestellung.

Einwirkung von Erde auf *Leuchtgas* wurde früher schon von *Bunte* (5) und *Biefel* und *Poleck* (4) untersucht. Sie ließen das Gas lange, mit Erde gefüllte Rohre passieren, wobei *Bunte* keine wesentliche Änderung der Zusammensetzung fand. *Biefel* und *Poleck* gaben eine solche an, insbesondere sollte der CO-Gehalt des Gases prozentual zunehmen. Es ist dies mindestens unerklärt.

Deutliches Verschwinden des CO aus dem mit Erde in Berührung stehenden Leuchtgas wurde dagegen von *C. Wehmer* beobachtet, wenn Topfpflanzen einige Wochen in einer Gasatmosphäre standen; dieselbe Wirkung hatte die Erde allein, aber nur, wenn sie nicht vorher sterilisiert wurde. Gifte hinderten den Prozeß.

Über die hierbei tätigen Bakterien liegen Feststellungen bislang nicht vor. Bekannt ist aber die Zersetzung von Wasserstoff und Methan durch Bodenbakterien, und es ist wahrscheinlich, daß diese auch bei der Leuchtgaszersetzung wirksam sind.

Kaserer (9) (10) hat als erster aus Erde Bakterien isoliert, die *Wasserstoff* zu oxydieren vermögen, und nach ihm ist viel über diese Knallgasbakterien gearbeitet worden (s. unten). *Söhngen* (21) u. a. kultivierten gleichfalls aus Erde *Methan* oxydierende Bakterien. Über die Zersetzung von *Kohlenoxyd* durch Bakterien liegen nur wenig Arbeiten vor. *Kaserer* (10) gab zwar kurz an, daß es von gewissen Bakterien (Bac. oligocarbophilus) assimiliert und verbrannt würde; einen Beweis brachte er dafür nicht, es fehlt bei ihm an jeglichen Versuchen in dieser Richtung. Assimilation des CO glaubte auch *Lantsch* (11) gesehen zu haben, auch hier ist das Experimentelle unzureichend.

Beweisende Versuche über die tatsächliche Zersetzung des CO durch Bodenorganismen brachte erst *C. Wehmer* (23). Das Verschwinden von mehreren Litern Kohlenoxyd unter Entstehung von Kohlensäure wurde experimentell verfolgt, die dabei tätigen Bakterien aber nicht näher berücksichtigt.

Dieser Stand der Fragen über das Verschwinden von Leuchtgas und Kohlenoxyd bei Berührung mit feuchter Erde forderte zu einer genaueren Bearbeitung auf. Meine Aufgabe war, die bei der Zersetzung der Gase beteiligten *Bakterien* zu isolieren und näher zu untersuchen.

II. Wirkung von Erde auf Leuchtgas und Kohlenoxyd[1]).

a) Verschwinden der Gase über feuchter Erde.

Um zu zeigen, daß die genannten Gase tatsächlich bei Berührung mit feuchter Erde eine Volumenverminderung erfahren, wurden in einer großen Glasschale zwei gleiche Bechergläser umgekehrt aufgestellt und gegen die Außenluft mit Wasser abgesperrt. Unter das eine der Gläser war vorher ein Topf mit Gartenerde gebracht, dann wurde die unter beiden Gläsern befindliche Luft durch Evakuieren entfernt (Ansaugen des Sperrwassers) und durch 250 ccm Leuchtgas ersetzt. Das Leuchtgas wurde der Laboratoriumsleitung entnommen und durch Waschen mit Wasser lediglich von den schwebenden Verunreinigungen befreit.

Bei sonst gleicher Versuchsanordnung wurden zwei weitere Bechergläser mit je 250 ccm *Kohlenoxyd* beschickt (durch Erhitzen von reiner Ameisensäure mit konzentrierter Schwefelsäure hergestellt, durch Waschen

---

[1]) Vgl. *C. Wehmer* (23).



mit Natronlauge und Wasser gereinigt. Das so hergestellte CO brannte vor der Flamme mit ruhigem, blauem Lichte ab.)

Beide Versuche wurden bei Zimmertemperatur und Lichtzutritt aufgestellt.

In den ersten Tagen nahm das Volumen der vier Bechergläser kaum ab. Nach etwa 8 Tagen begann das Sperrwasser des mit Erde und *Leuchtgas* beschickten Glases deutlich anzusteigen, nach etwa 3 Wochen war bereits der Erdtopf überflutet und nach 32 bis 35 Tagen nahm das Volumen nur noch wenig ab, ein kleiner Gasrest blieb zurück. Das mit Leuchtgas beschickte Becherglas *ohne Erde* zeigte sich in derselben Zeit fast unverändert.

Etwas später als bei dem Versuch mit Leuchtgas nahm auch das Volumen des mit *Kohlenoxyd* und Erde beschickten Becherglases ab. Aber erst nach 8 Wochen kam die Abnahme zum Stillstand; bis auf einen geringen Rest war alles Gas verschwunden, während bei dem *nicht mit Erde* beschickten Kontrollversuch das Volumen kaum sichtbar abgenommen hatte. Die Gasreste beider Versuche gaben beim Schütteln mit Kalkwasser deutliche Fällung von $CaCO_3$, meist war aber die gebildete Kohlensäure im Sperrwasser gelöst (Kalkwasser gab lebhafte Trübung). In den beiden Kontrollversuchen wurde Kohlensäure nur in den Spuren nachgewiesen, wie sie durch die aus der Luft gelöste geringe Menge bedingt war.

Das gleiche Resultat wurde auch bei Versuchen im *Vakuumexsikkator* unter Ausschluß von Wasser erzielt. Zwei Vakuumexsikkatoren, von denen nur in dem einen eine Schale feuchter Erde eingestellt war, wurden evakuiert und in einem Falle *Leuchtgas*, im anderen Falle Kohlenmonoxyd dafür eingeleitet. Der Exsikkator mit Erde zeigte in beiden Fällen Volumenabnahme. Beim Öffnen der Hähne wurden durch einen angeschlossenen Gummischlauch aus einem Meßzylinder beim *Leuchtgasversuch* nach 10 Tagen 45 ccm Wasser angesaugt, beim *Kohlenoxydversuch* nach 14 Tagen 18 ccm. Die beiden nicht mit Erde beschickten Versuche zeigten unter sonst gleichen Bedingungen *keine* Volumenabnahme (in den Exsikkatoren nach dem Öffnen kein Unterdruck.)

Woher der zur Oxydation nötige Sauerstoff genommen wird, steht dahin. In den Becherglasversuchen kann derselbe wohl aus der Luft durch das Sperrwasser diffundiert sein, bei den Versuchen im Exsikkator genügte voraussichtlich der beim Evakuieren besonders noch in der Erde verbleibende Luftrest.

Leuchtgas wie Kohlenoxyd werden also in Berührung mit feuchter Erde zersetzt. Schon die Volumenabnahme deutet auf eine Oxydation zu Kohlensäure.

b) Versuche mit steriler Erde.

Wenn die naheliegende Vermutung, daß es sich bei dieser *Oxydation* um eine Wirkung von in der Erde lebenden *Mikroorganismen* handelt, zutrifft, so muß man in der Lage sein, die Zersetzung aufzuhalten oder aufzuheben, sobald man die Vegetation in der Erde zerstört. Diese *Sterilisierung* kann auf verschiedene Art erfolgen, entweder durch Einwirkung trockener oder feuchter Hitze oder durch Zusatz von Desinfektionsmitteln.

Um zu beweisen, daß sterile Erde die Gase nicht zu zersetzen vermag, wurden von derselben Gartenerde vier Proben genommen, eine derselben durch *Glühen* sterilisiert, eine durch dreimal einstündiges Erhitzen in *strömendem Dampf*, eine durch Zusatz von *Sublimatlösung* und eine durch



Zusatz von *Carbolsäure.* Bei keiner der so behandelten Erdproben trat jetzt noch eine Abnahme weder von *Leuchtgas* noch von *Kohlenoxyd* ein, trotzdem völlig die gleiche Versuchsanordnung gewählt wurde wie in den oben beschriebenen Versuchen. Das Sperrwasser zeigte bei allen Bechergläsern noch nach 4 Wochen unveränderten Stand. Die Resultate stimmen also mit den von *C. Wehmer* (23) erhaltenen überein.

Die Annahme, daß das Verschwinden der beiden Gase bei Berührung mit feuchter Erde ein biologischer Vorgang ist, wird hierdurch bewiesen. Im Erdboden sind Mikroorganismen vorhanden, welche die Bestandteile des Leuchtgases sowie reines Kohlenoxyd unter Bildung von Kohlensäure zersetzen.

III. Zersetzung des Leuchtgases durch Bakterien.

a) Rohkultur der Bakterien.

Um diese Bakterien zu kultivieren und mit ihnen die Oxydation einwandfrei zu zeigen, bediente ich mich der bequemen Methode von *H. Kaserer* (10) bei der Kultur seiner Knallgasbakterien (umgekehrte Anwendung der *Einhorn*schen Gärkölbchen).

Die folgenden Versuche wurden zunächst nur mit *Leuchtgas* angestellt. Die Versuche mit *Kohlenoxyd* werden weiter unten beschrieben werden.

Drei größere, zu diesem Zwecke besonders hergestellte Gärkölbchen nach *Einhorn* wurden mit einer Nährlösung beschickt, die lediglich *Mineralsalze* enthielt, dagegen keine organische Kohlenstoffquelle. Solch mineralische Nährlösung (nach *Kaserer*) besteht aus:

100 g Aqua dest.	0,10 g NH_4Cl,	0,05 g $NaHCO_3$
(Spur $FeCl_3$)	0,05 g K_2HPO_4,	0,02 g $MgSO_4$

hatte also die Zusammensetzung der zur Kultur autotropher Bakterien üblichen (zuerst *Winogradski* 1893 für Stickstoffbakterien). Der organische C muß fehlen, um von vornherein das Wachstum der zahllosen im Erdboden vorkommenden Bakterien möglichst auszuschließen und nur die Arten anzuhäufen, die in der Lage sind, ihren C-Bedarf aus den im Leuchtgas vorkommenden C-Verbindungen zu decken.

Die mit der Nährlösung beschickten Gärkölbchen wurden am offenen Ende mit Watte verschlossen und sterilisiert. Beim Erhitzen flockte ein geringer gelblich-weißer Niederschlag aus (wohl Eisenphosphat). Um die damit verbundene leichte Trübung zu vermeiden, wurde weiterhin das Eisen fortgelassen, es ist für die Bakterienvegetation entbehrlich, jedenfalls genügen schon die geringsten Spuren, die in den gebräuchlichen Nährsalzen immer noch als Verunreinigung vorhanden sind. Kürzlich wurde angegeben, daß *Eisen* für die Kultur der autotrophen Bakterien unerläßlich sei [*Ruhland* (20)], nach meinen Erfahrungen trifft das nicht zu. Zwei der so vorbereiteten Gärkölbchen wurden mit einer Spur *Gartenerde* geimpft, das dritte blieb zur Kontrolle steril. In den ge-

schlossenen Schenkel aller drei Kölbchen wurden dann durch sterile Kapillare 30 ccm *Leuchtgas* geleitet und die Versuche in zerstreutem Tageslicht bei Zimmertemperatur ($\pm$ 20°) aufgestellt. Schon nach wenigen Tagen nahm das Volumen des Gases in den beiden infizierten Kölbchen langsam ab, nach 3 Wochen waren etwa 25 ccm verbraucht, worauf Stillstand eintrat. Ein kleiner Gasrest von etwa 4 bis 5 ccm blieb bei den geimpften Kölbchen unverbraucht. Das sterile Kontrollkölbchen hatte dagegen in den 3 Wochen nur 2 bis 3 ccm des gegebenen Leuchtgasvolumens verloren, wohl infolge Absorption der wasserlöslichen Bestandteile des Gases (CO_2 u. a.).

Eine Bakterienvegetation in Form eines sehr dünnen *Häutchens* erschien auf der Flüssigkeitsoberfläche im *geschlossenen* Schenkel der beiden geimpften Kölbchen im Gegensatz zu den Versuchen *Kaserers*, wo das Häutchen auf der Oberfläche des *offenen* Schenkels erschien. Um die Bakterien anzureichern, wurde aus dem geschlossenen Schenkel der unverbrauchte Gasrest vorsichtig mittels einer Kapillare abgesaugt und 30 ccm frisches Gas eingeleitet. Die Zersetzung ging jetzt bedeutend rascher vonstatten und war schon bis auf den stets bleibenden kleinen Rest nach 12 Tagen beendet. Die Bakterienhaut war gut entwickelt, die Nährlösung selbst hatte sich getrübt.

Mikroskopisch zeigte diese Rohkultur ein regelloses Gemisch beweglicher und unbeweglicher Kurz- und Langstäbchen.

Um die anspruchslosen heterotrophen Erdbakterien, die sich von den minimalen in der Erde der infizierten Kölbchen noch vorhandenen organischen Resten zu ernähren vermögen, ganz auszuschalten, wurden zwei weitere mit mineralischer Nährlösung beschickte Gärkölbchen nunmehr mit einer Spur der gewachsenen Bakterienhäute geimpft und dann 30 ccm Leuchtgas eingeleitet.

Die Erscheinung der Leuchtgaszersetzung war unter Ausschluß der Erdinfektion durch Bakterienimpfung übertragbar. Bereits nach 10 Tagen zeigte sich eine Haut auf der leicht getrübten Flüssigkeit, das Leuchtgasvolumen verminderte sich. Wurde wiederholt Gas in dasselbe Kölbchen geleitet, so steigerte sich die Oxydationsfähigkeit derart, daß 30 ccm desselben in 8 Tagen verschwanden. *Mikroskopisch* bestanden Haut und Trübung überwiegend aus kurzen, zum Teil beweglichen Stäbchen. Sporenbildung war nicht zu sehen.

Somit ist die Existenz Leuchtgas zersetzender Bakterien einwandfrei gezeigt. Die Bakterien oxydieren hier nicht nur das Gas, sie bauen auch ihre Zellsubstanz aus den Kohlenstoffverbindungen desselben auf (CH_4, CO, C_2H_4 u. a.), da ihnen organischer Kohlenstoff in keiner anderen Form geboten wurde. Leuchtgas dient also sowohl als Energiewie als Kohlenstoffquelle. Ob auch CO_2 in Betracht kommt, steht dahin.

*

b) Reinkultur der Bakterien.

Zur Reinzucht der Bakterien wurde zunächst von einer rohen Bakterienhaut durch wiederholtes Überimpfen in sterile mineralische Nährlösung eine möglichst reine Kultur hergestellt. Da die Abimpfung aus dem Schenkel der Gärkölbchen umständlich ist, wurden jetzt kleine Erlenmeyerkolben zur Kultur verwandt, mit Nährlösung beschickt (Watteverschluß), sterilisiert und mit einer Spur der rohen Häute geimpft. Die so präparierten Kolben stellte ich in einen Vakuumexsikkator, evakuierte, ließ statt der abgesaugten Luft *Leuchtgas* hinein und kultivierte die Kolben in der Leuchtgasatmosphäre bei Zimmertemperatur (Lichtzutritt).

Sehr beschleunigt ging das Wachstum der Bakterien vonstatten, als ich zwecks Begünstigung der Leuchtgaszersetzung nicht reines Gas, sondern ein *Sauerstoffleuchtgasgemisch* (2 : 1) gab. Jeden vierten Tag wurde das alte Gasgemisch abgesaugt und frisches eingeleitet. Schon nach 8 Tagen zeigten alle Kolben üppige Vegetation. Nachdem die Häute durch mehrfaches Überimpfen in neue mineralische Nährlösung hinreichend gereinigt waren, konnten dieselben für Reinzuchtzwecke verwandt werden. Es wurden von allen Häuten *Malzgelatineplatten* gegossen. Auf den bei Zimmertemperatur kultivierten Platten zeigten sich schon nach wenigen Tagen Kolonien, darunter auch verflüssigende. Nach 8 Tagen impfte ich von den zur Entwicklung gelangten Kolonien auf mineralische Nährlösung ab und züchtete in *Sauerstoff-Leuchtgasatmosphäre* im Exsikkator weiter. Bei keiner Abimpfung zeigte sich jedoch innerhalb von 4 Wochen Wachstum, auch nicht nach wiederholter Nachimpfung.

Die auf der Platte gewachsenen Kolonien schienen also nur verunreinigende Mikroorganismen zu sein, welche die Platte überwucherten, ehe die Leuchtgas zersetzenden Bakterien zur Entwicklung kamen.

Den gleichen negativen Erfolg hatte die versuchte Reinkultur auf *Malzagar* und anderen gebräuchlichen organischen Nährböden. Es wuchsen zwar auch hier bald Kolonien, aber keine der Abimpfungen zeigte Wachstum in Leuchtgasatmosphäre, sobald der organische Kohlenstoff fortgelassen wurde.

Erfolg hatten die Reinzuchtsversuche erst, als ein *kohlenstofffreier* Nährboden verwandt wurde. Benutzt wurde mineralische Nährlösung mit Zusatz von 2 Proz. *Agar*, der mehrere Wochen lang mit destilliertem Wasser gewaschen war, um alle löslichen organischen Verbindungen aus ihm zu entfernen. Zwar verliefen auch diese Versuche anfänglich nicht so ganz glatt. Da mit längerer Kultur zu rechnen war, mußten die Platten zur Verhinderung des Austrocknens in einer feuchten Kammer gezogen werden, durch das verdunstende Wasser der Kammer und das Quetschwasser des Agars wurden die Kulturen aber verschmiert. Beim Kultivieren im Exsikkator zerrissen beim Evakuieren häufig die Agarschichten. Erst nach einiger Übung gelang es, tadellose Platten zu erhalten. Dieselben wurden in *Sauerstoff-Leuchtgasatmosphäre* kultiviert, und dabei zeigte sich nach Verlauf von 2 bis 3 Wochen eine lebhafte Entwicklung von Kolonien, die schon makroskopisch voneinander unterschieden werden konnten.

Zunächst fielen auf allen Platten kleine, trockene, *schneeweiße Kolonien* auf, die in ihrem Aussehen an junge, sterile Pilzkolonien erinnerten (deren weißes Mycel noch nicht durch die Sporenfarbe verdeckt ist). Daneben wuchsen reichlich *grauweiße Kolonien*, die sich rasch in ganz dünner Schicht über die Platte verbreiteten. Ferner dicke, *grünlich-gelbe*, schleimige Kolonien und endlich vereinzelt *rosa-fleischfarbene Kolonien*. Alle Kolonien ließen

sich auf mineralische Nährlösung übertragen und ergaben bei Kultur in *Sauerstoffleuchtgas lebhaftes Wachstum.* Auch hier fiel wieder das rein schneeige Aussehen der ersten Form auf, die auf der Flüssigkeit ohne die geringste Trübung dicke, weiße, trockene *Inseln* zeigte. Die anderen Formen wiesen *Hautbildung* mit gleichzeitiger *Trübung* auf. Von jeder der vier isolierten Arten wurden nochmals Platten gegossen, die Kolonien dann im Strich auf Agarröhrchen abgeimpft und in Leuchtgas kultiviert.

Die so erhaltenen vier Formen seien der Einfachheit halber zunächst mit Nummern bezeichnet, und zwar:

Nr. 1. Dicke, trockene, *reinweiße* Auflagerung. *Mikroskopisch* unbewegliche Stäbchen, etwa 0,8 . 4 μ, daneben auch kürzere Stäbchen, Keine Sporen.

Nr. 2. Dünne, sich rasch verbreitende, *grau-weiße* Haut, *mikroskopisch* dickes, wenig *bewegliches* Stäbchen, 2 . 4 μ. Keine Sporen.

Nr. 3. Dicke, *grünlich-gelbe,* schleimige Auflagerung, *mikroskopisch* Kurzstäbchen, 0,5 . 1,5 μ. In jungen Kulturen lebhaft *beweglich.* Keine Sporen.

Nr. 4. *Fleischfarbene* Auflagerung, *mikroskopisch* unbewegliche Stäbchen, 0,5 bis 1 . 3 bis 4 μ. Keine Sporen.

Bakterien, die *Leuchtgas* sowohl als *Kohlenstoff-* wie als *Energiequelle* zu benutzen vermögen, sind bislang nicht beschrieben worden; allerdings ist Leuchtgas ein Gemisch von Gasen [H, CH_4, CO, N, C_2H_4, C_6H_6, CO_2 und anderen[1])]. Die sehr auffällige Wuchsform der Bakterien Nr. 1, ihre trockenen, schneeweißen Vegetationen, erinnerten stark an die Bakterie, welche *Beijerinck* und *van Delden* (1) zuerst kultiviert und beschrieben haben. Dieselben erhielten auf mineralischer Nährlösung mit Gartenerde geimpft nach einigen Wochen eine schneeweiße, trockene und schwierig benetzbare Haut und isolierten daraus ein unbewegliches *Kurzstäbchen* (Bac. oligocarbophilus), von dem sie nur wußten, daß dasselbe ohne zugesetzten organischen Kohlenstoff wuchs und den Kohlenstoff offenbar aus der Luft nahm, ohne daß sie über die Natur der aufgenommenen C-Verbindung ins klare kamen.

Dieselbe Bakterienart erhielt anscheinend später auch *Kaserer* (10) bei der Kultur von Bakterien, die *Wasserstoff* oxydieren können, und vermutete, daß Kohlenoxyd als C-Quelle in Frage käme, was auch mit dem Befund von *Beijerinck* und *van Delden* in Einklang stehen sollte, da Kohlenoxyd nach Meinung *Kaserers* infolge unvollständiger Verbrennung des Leuchtgases stets in der Laboratoriumsluft vorhanden sei.

Kaserer wies jedoch das Kohlenoxyd in der Luft nicht nach, es liegen aber von *Spitta* (22) u. a. Versuche vor, in denen CO in der Luft in minimalen Mengen festgestellt wurde. Ich selbst habe bei langsamem Durchleiten der Laboratoriumsluft durch eine $PdCl_2$-Lösung aus etwa 1 cbm Luft Spuren von Pd (als schwarzer Beschlag des Kolbens) erhalten und somit das Vorhandensein von CO nachgewiesen.

Identität des Bac. oligocarbophilus *Beijerinck* und *van Delden,* den *Kaserer* (aus Wasserstoff oxydierenden Rohkulturen) erhielt, und der CO veratmen sollte, mit meiner Bakterie Nr. 1 ist wahrscheinlich, da Wasserstoff und Kohlenoxyd einen wesentlichen Teil des Leuchtgases ausmachen

---

[1]) Nährfähigkeit von *Kohlenwasserstoffen* ist mehrfach angegeben. Vgl. *Lieske,* Allgemeine Bakterienkunde, S. 94.



(H = 45 bis 50 Proz., CO = 8 bis 10 Proz.). Als ich Versuche anstellte, *Sauerstoff-Leuchtgasgemische* mit den einzelnen Reinkulturen der vier isolierten Bakterienarten zu zersetzen, ergab sich dann folgende auffällige Tatsache.

Zunächst verschwand das Gas teilweise, aber bald kam die Zersetzung bei einem bestimmten Punkte zum Stillstand, ein Teil des Gases blieb stets unverbraucht. Anscheinend griff jede der Bakterienarten nur einen bestimmten Bestandteil des Gases an, so daß also für die Oxydation von Wasserstoff, Methan und Kohlenstoff je eine spezifisch wirksame Bakterie in Frage kämen.

Zur Klärung dieser Verhältnisse wurden daher Versuche mit den einzelnen Komponenten des Leuchtgases angestellt, um die diese Gase zersetzenden Bakterien zu isolieren und mit den aus Leuchtgaskulturen erhaltenen Arten zu vergleichen.

c) *Kultur von Wasserstoffbakterien.*

Oxydation des *Wasserstoffs* durch Heideerde u. a. ist seit 1839 bekannt, 1892 hat *Immendorf* (8) als erster das Verschwinden von Knallgas über frischer Erde auf Wirkung von *Bakterien* zurückgeführt.

1906 zeigte *Kaserer* (9) (10) seine Oxydation und isolierte die Bakterien. Weiterhin ist dann wiederholt über diese Frage gearbeitet worden. Hauptsächlich *Nabokich* und *Lebedeff* (14), *Lebedeff* (12), *Niklewski* (15) (16) (17), *Grohmann* (6) und *Ruhland* (19) (20) beschäftigten sich mit den Knallgasbakterien. Besonders *Niklewski* (16) und *Ruhland* (20) haben in größeren Arbeiten die Verhältnisse verfolgt und hinreichend geklärt. Das Ergebnis ist, wenigstens soweit es für diese Arbeit von Interesse ist, kurz zusammengefaßt folgendes:

Es gibt Bakterien, die *Wasserstoff* bei Gegenwart von Sauerstoff (etwa im Verhältnis 2 : 1) zu oxydieren vermögen. Das Wachstum dieser Bakterien auf Nährböden ohne organischen Kohlenstoff ist an das Vorhandensein von *Kohlensäure* gebunden, welche reduziert und so als Kohlenstoffquelle verwandt wird. Die Energie liefert die Wasserstoffoxydation. Die Knallgasbakterien sind ganz allgemein in zahlreichen Arten in den oberen Erdschichten verbreitet.

Ihre Kultur bereitet keine großen Schwierigkeiten. Ich verfuhr folgendermaßen: drei Erlenmeyerkolben wurden mit der bekannten mineralischen Nährlösung beschickt, mit einer Spur Gartenerde geimpft und unter eine geräumige Glasglocke gestellt, die gegen die Außenluft durch Sperrwasser abgeschlossen war. Durch Zuleitungs- und Ableitungsrohr wurde so lange freier *Wasserstoff* durch die Glocke geleitet, bis das beim Ableitungsrohr austretende Luftwasserstoffgemisch an der Flamme mit lautem Knall explodierte. Der Wasserstoff wurde aus reinem Zink und reiner konzentrierter Schwefelsäure hergestellt und durch Waschen mit Kalilauge und Kaliumpermanganat gereinigt. Sodann wurden zu dem Gasgemisch unter der Glocke mehrere Kubikzentimteer *Kohlensäure* gegeben, das Zu- und Ableitungsrohr entfernt.

Nach 8 Tagen zeigte sich auf dem Kolben deutliches Wachstum. Alle drei Kolben wiesen eine fettige, gelblich-weiße Haut und starke Trübung der Flüssigkeit auf. Volumenabnahme war merklich, das Sperrwasser war nach 12 Tagen erheblich in der Glocke angestiegen. Drei neue, mit derselben Nährlösung beschickte Kolben wurden nunmehr mit Spuren der gewachsenen Häute geimpft und unter gleichen Bedingungen kultiviert.

Auch hier schon nach 5 Tagen Wachstums einer aus kleinen, zum Teil lebhaft beweglichen Stäbchen bestehenden Haut.

Die von den jungen Häuten gegossenen Agarplatten wurden unter einer Glocke in *Knallgasatmosphäre* gebracht, nach 14 Tagen war deutliches Wachstum sichtbar. Zunächst erschienen winzige Kolonien, die aber schon im Entwicklungsstadium stehen blieben und auch nach längerer Kultur nicht größer wurden, also anscheinend nur verschleppte Erdbakterien waren, denen hier die Lebensbedingungen fehlten. Sodann zeigten sich überall Kolonien, deren makroskopisches Aussehen sofort mit den aus Leuchtgaskulturen isolierten Formen Übereinstimmung zeigte. Die trockenen *schneeigen* Kolonien, die *gelblich-grünen* schleimigen und die *rötlich-fleischfarbenen* Kolonien waren auch hier ohne weiteres zu erkennen. Die vierte Form, meine Bakterien Nr. 2, fehlte. Die Kolonien wurden in Strichkulturen auf Agar geimpft, sie zeigten auch hier dasselbe makroskopische und mikroskopische Aussehen wie meine Bakterien Nr. 1, 3 und 4. Die Abimpfungen beider Isolierungen wuchsen sowohl in *Knallgas-* als auch in *Sauerstoff-Leuchtgas-Atmosphäre.*

Somit steht fest, daß die aus Leuchtgaskulturen isolierten Arten mit diesen Knallgasbakterien identisch sind. Bei Durchsicht der Literatur nach Bakterienarten, die vielleicht mit den von mir isolierten Formen übereinstimmen, wurde festgestellt, daß zwei meiner Formen offenbar bereits beschrieben sind. Bei der Bakterie Nr. 1 handelt es sich nach allem um den *Bacillus oligocarbophilus* von *Beijerinck* und *van Delden*, das autotrophe Wachstum wie auch der makroskopische und mikroskopische Befund macht das sehr wahrscheinlich. Die Bakterie Nr. 3 ist anscheinend identisch mit dem *Bacillus pantotrophus*, den *Kaserer* (9) (10) aus *Wasserstoff*-rohkulturen erhielt. Beide veratmen Wasserstoff, sind bewegliche Kurzstäbchen 1,0 bis 1,5 . 0,1 bis 0,5 μ, wachsen in *grünlich-gelben*, *oft* zähschleimigen Kulturen. Die dritte isolierte Form Nr. 4 konnte in der Literatur, soweit sie mir zur Verfügung stand, nicht gefunden werden. Es kann dies nicht verwundern, da ja bekannt ist, daß bei der Untersuchung neuer Erdproben auch fast stets neue Knallgasbakterien isoliert werden können [*Grohmann* (6), *Ruhland* (20)].

Von den vier aus Leuchtgas isolierten Arten kommt also dreien die Fähigkeit der *Wasserstoffoxydation* zu. Jetzt erklärt sich auch der Befund, daß die Oxydation des Gases mit Reinkulturen bei einem bestimmten Punkte zum Stillstand kommt. Die Reinkulturen veratmen aus dem Leuchtgas lediglich den *Wasserstoff*, während *Methan* und *Kohlenoxyd* nicht angegriffen werden.

Da neben *Wasserstoff* auch *Methan* bekanntlich einen wesentlichen Bestandteil des Leuchtgases darstellt (30 bis 35 Proz.), ebenso Kohlenoxyd (8 bis 10 Proz.), war nun zu vermuten, daß man aus den Leuchtgasrohkulturen auch Bakterienformen isolieren kann, die mit den *Methan-* und *Kohlenoxydbakterien* identisch sind. Vorweg sei schon bemerkt, daß sich diese Annahme tatsächlich für beide Bakterienarten bestätigte.

d) *Kultur der Methanbakterien.*

Kaserer (9) stellte seinerzeit fest, daß gewisse Bakterien *Methan* als C-Quelle ausnützen können. Kurz darauf zeigte *Söhngen* (21), daß Methan sowohl als Stoff- wie als Energiequelle (Oxydation zu CO_2) dient. Genauer untersucht wurde die Methanoxydation von *Münz* (13).

Nach der Vorschrift von *Söhngen* (21) wurde zum Vergleich mit den Leuchtgasbakterien auch eine *Methan* oxydierende Bakterie aus der Erde isoliert. Nährlösung:

100 g Aqua dest.	0,05 g K_2HPO_4
0,1 g $MgNH_4PO_4$	0,02 g $CaSO_4$

Drei Erlenmeyerkolben, mit dieser Lösung beschickt, wurden mit Erde geimpft und unter einer Glocke einer Atmosphäre von ein Drittel *Methan* und zwei Drittel *Luft* ausgesetzt (30 bis 35°, zerstreutes Tageslicht). Das Gas wurde durch Erhitzen von Natriumacetat mit Ätznatron hergestellt und mit Wasser gewaschen.

Nach wenigen Tagen schon bildete sich eine schmutzig-graue Haut auf der Lösung, die durch wiederholtes Überimpfen auf frische Nährlösung möglichst gereinigt wurde. Von jungen Häuten wurden Platten mit mineralischem Nähragar gegossen. Nach achttägiger Kultur unter der Glocke in *Methan-Luftatmosphäre* entwickelten sich auf allen Platten reichlich Kolonien eines Bazillus, der auf Agar in dünnen, sich schnell verbreitenden, grau-weißen Häuten wuchs. Unter dem *Mikroskop* zeigte sich ein bewegliches, dickes Stäbchen von 2 . 3 bis 4 μ. Dasselbe war allem Anschein nach identisch mit dem *Bacillus methanicus Söhngen* und wuchs auch in *Leuchtgas* auf Kosten des in demselben vorhandenen Methans.

Nach dem makroskopischen und mikroskopischen Befund sowie nach der chemischen Leistung ist die isolierte Bakterie nicht nur mit dem *Bac. methanicus Söhngen* identisch, sondern auch mit der aus Leuchtgaskulturen erhaltenen Bakterie Nr. 2, da derselben ebenfalls die Fähigkeit zukommt, *Methan* zu veratmen.

Zusammengefaßt kann also über die *Leuchtgaszersetzung* folgendes gesagt werden:

Leuchtgas verschwindet bei Berührung mit feuchter Erde unter Anreicherung von Kohlensäure infolge Wirkung von Erdbakterien, von denen *vier Arten* isoliert werden konnten.

Der Vorgang ist kein einheitlicher, sondern für jeden Bestandteil sind spezifische Bakterienarten wirksam. Von den vier isolierten Formen kommt dreien die Fähigkeit der *Wasserstoffoxydation*, einer die der *Methanoxydation* zu.

Drei der aufgefundenen vier Spezies sind in der Literatur schon beschrieben und zwar:

Bakterie Nr. 1 = Bac. *oligocarbophilus Beijerinck* und *van Delden*,
,, ,, 2 = ,, *methanicus Söhngen*,
,, ,, 3 = ,, *pantothrophus Kaserer*.
,, ,, 4 = noch nicht beschrieben.

IV. Die Zersetzung des Kohlenoxyds.

Die interessantere Frage ist die der Oxydation des *Kohlenoxyds* durch Bakterien, die noch wenig erforscht ist. Daß in der Erde Bakterien vorkommen, die Kohlenoxyd zu zersetzen vermögen, ist schon zu Beginn der Arbeit bewiesen [s. auch *C. Wehmer* (23)]. In der Literatur finden

sich nur einzelne kurze Angaben, und die bakteriologischen Werke begnügen sich meist mit dem Hinweis, daß es Bakterien geben soll, die Kohlenoxyd veratmen und zwar auf Grund der Angaben von *Kaserer* (10).

Kaserer, der über *Knallgasbakterien* arbeitete, beimpfte eine mineralische Nährlösung mit Erde und setzte sie dann einer Knallgasatmosphäre aus, wobei nach mehreren Tagen eine Bakterienvegetation auftrat; er unterschied zwei Fälle. Entweder trübte sich die Kulturflüssigkeit *ohne* Hautbildung, dann bestand die Rohkultur im wesentlichen aus einem kleinen, beweglichen Kurzstäbchen, das er *Bacillus pantothrophus* nannte, oder es zeigte sich *Hautbildung*, dann erhielt er ein unbewegliches Stäbchen, das er nach dem makroskopischen und mikroskopischen Aussehen als den *Bacillus oligocarbophilus* benannte, den *Beijerinck* und *van Delden* (1) kurz vorher aus Erde isoliert hatten. Während *Kaserer* seinen *Bac. pantothrophus* leicht in Reinzucht erhalten konnte, gelang es ihm nicht, weder auf organischen Nährböden, noch auf anorganischem Substrat in Wasserstoffatmosphäre den *Bac. oligocarbophilus* rein zur Entwicklung zu bringen. Durch Kultur auf mineralischen Lösungen an der Luft erhielt er Reinkulturen, aber diese konnten *nicht* Wasserstoff oxydieren. Rohkulturen oxydierten also, Reinkultur nicht. *Kaserer* isolierte nach *Beijerincks* Vorschrift den *Bac. oligocarbophilus* durch Kultur einer mineralischen, mit Erde beimpften Nährlösung an der Luft, derselbe zeigte ähnliches Verhalten. Reinkulturen oxydierten nicht, Mischkulturen mit den verunreinigenden Organismen (Fluoreszenten) oxydierten bald, bald nicht. Als er Versuche anstellte, das *Kohlenoxyd* auf seine Brauchbarkeit für Erdbakterien zu prüfen, erhielt er auch hier Vegetation des *Bac. oligocarbophilus*. Er kultivierte die Bakterien in *Einhorn*schen Gärkölbchen, die mit mineralischer Lösung beschickt und mit Erde geimpft wurden. In den geschlossenen Schenkel wurde *Kohlenoxyd* eingeleitet, das nur teilweise verschwand. Auch die Reinkultur sollte Kohlenoxyd veratmen, jedoch kam die Reaktion bald zum Stillstand, weil, wie *Kaserer* annimmt, die gebildete Kohlensäure für den Organismus schädlich ist. Diese Annahme hat wenig für sich, da wohl anzunehmen ist, daß die gebildete geringe Kohlensäuremenge sich bald in der Kulturflüssigkeit löst und langsam an die Außenluft abgegeben wird. Als *Kaserer* versuchte, die Bakterien unter Glocken zu ziehen, unter die zur Absorption der Kohlensäure ein Gläschen mit Kalilauge gebracht wurde, war das Resultat auch hier nicht befriedigend, da die Mikrobe aus unbekannten Gründen oftmals nicht wuchs. Trotzdem nahm der Verfasser als sicher feststehend an, daß eine Veratmung von Kohlenoxyd stattfand.

Die Tatsache paßte zwar gut zu dem Befund von *Beijerinck* und *van Delden* (1), deren Mikrobe an der Luft ohne zugesetzten organischen Kohlenstoff gedieh und seinen Kohlenstoffbedarf offenbar aus der Luft deckte. Die Verfasser glaubten, daß es sich bei dem aufgenommenen Körper um den kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Bestandteil der Luft handelte, den *Henriet* (7) entdeckte und der nach dessen Angaben ein substituiertes Formamid sein soll. *Kaserer* nimmt dagegen an, daß die aus der Luft aufgenommene Verbindung *Kohlenoxyd* ist, das infolge unvollständiger Verbrennung des Leuchtgases in der Laboratoriumsluft vorhanden sein sollte.

In neuerer Zeit hat *Lantzsch* (11) noch über den *Bac. oligocarbophilus* gearbeitet. Derselbe bemerkte auf der Oberfläche von destilliertem Wasser, das abgedeckten Quarz bedeckte, im Laufe der Zeit eine Bakterienhaut,

dünn, schneeweiß und sehr trocken, die er als *Bac. oligocarbophilus Beijerinck* ansah. Er impfte die Haut, die also ohne Kohlenstoff an der Luft gewachsen war, in eine Lösung von

80 g Aqua dest. 0,01 g K_2HPO_4, Spur $FeCl_3$,
20 g Leitungswasser 0,01 g $NaNO_3$, Spur $MgSO_4$.

Die damit erhaltene Kultur zeigte mikroskopisch *Fäden* und Stäbchen, daneben Kokken, beide vom Durchmesser 0,5 μ. Während *Beijerinck* seine Mikrobe als kokkenartiges Kurzstäbchen schildert, erhielt *Lantzsch* überwiegend eine fädige Wuchsform und nannte sie daher *Actinomyces oligocarbophilus*. Da die organische Verunreinigung der Luft, die für die Bakterie offenbar als Kohlenstoffquelle in Betracht kam, dem Verfasser nicht bekannt war, kultivierte er sie auf der oben angeführten Nährlösung in einer Atmosphäre von

1. Ameisensäure,
2. Formaldehyd,
3. Essigsäure,
4. Aceton,
5. Buttersäure,
6. Benzol,
7. Xylol.

Als Resultat dieser Versuche ergab sich, daß beide Formen, sowohl die fädige, als auch die kokkenartige selbst in Reinkultur nebeneinander bestehen, er sah das als eine „Reaktion“ auf die gebotene Kohlenstoffquelle an; je nach der Natur dieser überwiegen bald Kokken, bald Fäden.

Auch mit *Kohlenoxyd* stellte *Lantzsch* wohl mehr beiläufig einen Versuch an, indem er Abimpfungen des *Bac. oligocarbophilus* in einem 5-Liter-Exsikkator kultivierte, in den er ein Röhrchen mit 1 ccm *Kohlenoxyd* brachte, das er nach Schließen des Deckels „umstieß“. Nach 4 Wochen wurde Vermehrung beobachtet, und zwar überwog die *Aktinomyces*form, bei der echte Verzweigung zu sehen war, während bei den Versuchen mit *Ameisensäure*, *Formaldehyd*, *Essigsäure*, *Aceton* und *Buttersäure* die *Kokken*form überwog. Hieraus schließt der Verfasser, daß die Bakterie in ihrer fädigen Wuchsform *Kohlenoxyd* assimiliert, in ihrer Form als *Kokkus* dagegen Vertreter der Fettsäuren.

Schließlich stellte *Lantzsch* noch Versuche an, ob die Bakterie *Wasserstoff* oxydieren konnte, sowohl in Reinkultur als auch in Symbiose mit anderen Bakterien. Beide Fragen wurden verneint.

Diese zum Teil widersprechenden, zum Teil unvollständigen Angaben zeigen, daß noch ein großer Fragenkomplex betreffend Oxydation des *Kohlenoxyds* durch Bakterien zu beantworten ist. Der Nachweis einer wirklichen Oxydation desselben mit sicheren Reinkulturen des *Bac. oligoc.* unter Bildung von CO_2 ist bislang nirgend erbracht. Auch das Verhalten der Bakterie zum *Wasserstoff* bedarf der Klärung, hier widersprechen einander die Angaben völlig, *Kaserer* behauptet die Oxydation, *Lantzsch* bestreitet sie. Ich habe dann der Theorie von *Lantzsch* über den gesetzmäßigen Formenwechsel einige Aufmerksamkeit geschenkt und auch die Notwendigkeit der Sauerstoffzufuhr geprüft, da *C. Wehmer* (23) eine anaerobe Oxydation des Kohlenoxyds durch andere Bakterien beobachtete, die *Kaserer* nicht gelang. Weiterhin wurden Verbreitung und Zahl der Kohlenoxydbakterien, Einfluß von *Temperatur* und *Licht* auf die Oxydation und schließlich die morphologischen und physiologischen Verhältnisse etwas näher verfolgt.

a) Kultur der Bakterien.

Zwecks Erlangung von Rohkulturen zum Verfolg der Oxydation wurden wieder die Gärkölbchen nach *Einhorn* verwandt (Abb. 1.) Sieben



Abb. 1.
Kultur des B. oligocarbophilus in *Einhorn*schen Gärkölbchen.

Kölbchen wurden mit mineralischer Nährlösung beschickt, mit Watte verschlossen und sterilisiert. Die Lösung enthielt [nach Vorschrift *Lantzsch* (11)]:

80 g Aqua dest., 0,05 g $NaNO_3$,
20 g Leitungswasser, 0,02 g K_2HPO_4, 0,02 g $MgSO_4$.

Sechs Gärkölbchen wurden mit etwas frischer *Gartenerde* beimpft, das siebente blieb zur Kontrolle steril. Dann wurde in den geschlossenen Schenkel aller sieben Kölbchen reines CO mittels einer sterilen Kapillare eingeleitet und bei fünf Versuchen auch freier Sauerstoff zugegeben. Die Kölbchen erhielten:

Kolben Nr. 1 und 2	Kolben Nr. 3 und 4	Kolben Nr. 5 und 6	Kolben Nr. 7
30 ccm CO — O_2	20 ccm CO 10 „ O_2	10 ccm CO 20 „ O_2	20 ccm CO 10 „ O_2
mit Erde beimpft			unbeimpft

Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur im zerstreuten Tageslicht aufgestellt.

In den ersten Tagen nahm das Gasvolumen aller Kölbchen ziemlich gleichmäßig nur wenig ab (etwa 1 bis 1½ ccm). Erst nach 8 Tagen begannen die Kölbchen voneinander erheblich abzuweichen, die mit Kohlenoxyd und Sauerstoff beschickten zeigten deutliche Volumenverminderung. Wo nur Kohlenoxyd gegeben wurde, mußte der zur Oxydation nötige Sauerstoff offenbar erst aus der Außenluft durch

die Flüssigkeit diffundieren. Innerhalb von 40 Tagen zeigten die Kölbchen folgenden Stand.

Kölbchen	Gegebenes Volumen	Volumenabnahme in ccm			
		12 Tage	20 Tage	30 Tage	40 Tage
1	30 CO	4	$10^1/_2$	25	28
2	— O_2	$4^1/_2$	$9^1/_2$	$21^1/_2$	27
3	20 CO	9	18	23	23
4	10 O_2	$7^1/_2$	$16^1/_2$	21	$21^1/_2$
5	10 CO	11	11	11	$11^1/_2$
6	20 O_2	10	11	11	11
7	20 CO 10 O_2	1	1	$1^1/_2$	$1^1/_2$

Die Zersetzung war bei den Kölbchen 5 und 6 also nach 12 bis 14 Tagen beendet, bei den Kölbchen 3 und 4 nach etwa 22 Tagen. In den Versuchen 1 und 2 verlangsamte sich nach etwa 4 Wochen die Volumenabnahme, so daß selbst nach 6 Wochen immer noch ein kleiner Rest übrigblieb. Das Kontrollkölbchen behielt sein Volumen fast unverändert. Daß die Versuche 3 bis 6 eine etwas größere Abnahme zeigen, als dem zugesetzten Volumen Kohlenoxyd entspricht, erklärt sich wohl aus dem Verbrauch einiger Kubikzentimeter des zugefügten Sauerstoffs für die Oxydation. Die Zersetzung in den Kölbchen 3 bis 6 war eine vollständige, der übrigbleibende Sauerstoffrest gab mit *Palladiumchlorürpapier* keine Reaktion mehr. In den Kölbchen 1, 2 und 7 trat noch sofort Schwärzung des Papiers ein[1]).

Daß die Zersetzung meines Gases kein rein physikalisch-chemischer Vorgang ist, ist wohl anzunehmen. Kohlenoxyd wird nach Angaben von *Potain* (18) mit Sauerstoff im Lichte nur außerordentlich langsam oxydiert. Eine vielleicht denkbare katalytische Beschleunigung durch einen mit der Erde eingeimpften Stoff kommt schwerlich in Frage, da die Erscheinung der Oxydation (unter Ausschluß der Erdinfektion) durch Bakterienimpfung übertragbar ist. Auch die Löslichkeit des Kohlenoxyds spielt bei der Volumenabnahme keine Rolle, da dieselbe äußerst gering ist, wie das auch der sterile Kontrollversuch gezeigt hat. Die Oxydation des Kohlenoxyds zu Kohlensäure (in der Kulturflüssigkeit mit Kalkwasser nachgewiesen) ist zweifellos ein biochemischer Vorgang.

[1]) Die Reaktion mit Palladiumchlorür auf Kohlenoxyd ist hinreichend empfindlich. *Potain* (18) konnte noch 1 ccm Kohlenoxyd in 10 Liter Luft beim Durchleiten durch $PdCl_2$-Lösung nachweisen. Eigene Versuche mit Palladiumpapier ergaben, daß noch 2 ccm Kohlenoxyd in 800 ccm Luft — also in einer Konzentration von 0,25 Proz. — durch Schwärzung des Palladiumpapiers nachweisbar sind.

Bakterienvegetation trat in den Versuchen auf der Flüssigkeitsoberfläche des offenen Schenkels der Gärkölbchen 1 bis 6 auf. Ausnahmslos zeigte sich eine dünne, weiße, bläulich schimmernde Haut ohne Trübung, die unter dem Mikroskop ein Gewirr von Kokken und überwiegenden Stäbchen ergab, ohne Eigenbewegung.

Die Häute wurden auf sechs neue Gärkölbchen übergeimpft und diese alle mit einem Gemisch von *einem Drittel Kohlenoxyd* und *zwei Drittel Sauerstoff* beschickt. Es zeigte sich nach 8 Tagen Wachstum auf dem *äußeren* Schenkel bei gleichzeitiger Volumenabnahme. Die Oberfläche im *inneren* Schenkel blieb auch hier ohne Vegetation, eine Beobachtung, die auch schon *Kaserer* (10) machte, und die er aus der Abneigung der Bakterie gegen zu große Kohlenoxydkonzentration und Kohlensäure zu erklären sucht.

Von den jungen Häuten wurden nun *Agar*platten gegossen (Mineralsalzlösung mit 2 Proz. gewässertem Agar). Die Platten wurden unter der Glocke in *Kohlenoxyd-Sauerstoffatmosphäre* bei Zimmertemperatur gehalten. Nach 14 Tagen zeigten sich auf allen Platten weiße Kolonien, die unschwer als solche des *Bac. oligoc.* erkannt wurden, wie er sowohl aus Leuchtgas- als auch Knallgaskulturen isoliert wurde. Von den Kolonien wurden dann nochmals Platten gegossen und die erhaltenen reinen Kolonien auf Agar im Strich abgeimpft (Abb. 2 u. 3).

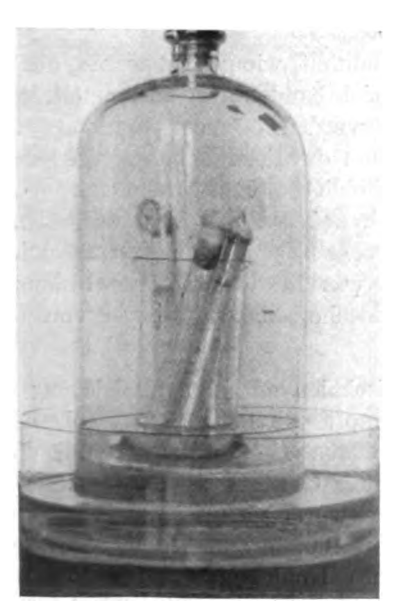


Abb. 2.
Kultur des B. oligoc. unter Glocken in CO-Atmosphäre.



Abb. 3.
Strichkulturen des B. oligoc.

Auch das mikroskopische Bild entsprach völlig dem des aus Knallgashäuten gezogenen *Bac. oligoc.* Aus allen sechs Kulturen konnte nur diese eine Bakterienart isoliert werden, die autotroph von Kohlenoxyd zu leben vermag. Zahlreiche andere Kolonien, die noch auf den Platten wuchsen, blieben schon auf der allerersten Entwicklungsstufe stehen, ihnen fehlte hier die nötige Kohlenstoffquelle, und sie vermochten *Kohlenoxyd* nicht als C-Nahrung zu verwenden.

Die Existenz einer Bakterie (Bac. oligocarbophilus), die ihren C-Bedarf lediglich aus dem *Kohlenoxyd* zu decken vermag, ist somit wohl zum ersten Male völlig einwandfrei bewiesen. *Kaserer* kultivierte dieselbe an der *Luft* zwar ebenfalls, aber seine Versuche mit *Kohlenoxyd* zeigten stets Schwierigkeiten, da entweder das Wachstum ganz ausblieb, oder die Zersetzung des Gases bald zum Stillstand kam. *Lantzsch* stellte in *Kohlenoxydatmosphäre* (*ein* Versuch mit 1 ccm CO auf 5 Liter Luft), nach 4 Wochen Kultur Vermehrung des *Bac. oligoc.* fest, zeigte aber nicht, daß das Kohlenoxyd tatsächlich verbraucht war, denn bekanntlich wächst die Bakterie auch schon an der Luft in 4 Wochen ganz erheblich. Die vorliegenden Versuche zeigen aber, daß ohne Zusatz einer organischen C-Quelle sich die Mikrobe in wenigen Tagen auf Kosten des gebotenen Kohlenoxyds entwickelt. Besondere Schwierigkeiten stellten sich auf der Reinkultur im Kohlenoxyd nicht in den Weg.

b) Oxydation von Kohlenoxyd mit Reinkulturen.

Rohkulturen des *Bac. oligoc.* kommt, wie gezeigt wurde, die Fähigkeit zu, CO zu oxydieren, wobei sich Kohlensäure ansammelt. In dem oben beschriebenen Vorversuch wurden 500 ccm Kohlenoxyd ohne Zusatz von Sauerstoff in 8 Wochen oxydiert. Zusatz von Sauerstoff beschleunigte die Oxydation erheblich. Es wurden nun Versuche angestellt, um zu zeigen, daß auch *Reinkulturen* dieser Bakterien nicht nur in Kohlenoxydatmosphäre *wachsen*, sondern auch tatsächlich das Gas zu Kohlensäure oxydieren, was in der Literatur bislang nicht einwandfrei gezeigt ist. Die Tatsache selbst wird zwar von *Kaserer* behauptet, doch nicht bewiesen.

Hierzu wurden hohe Doppelschalen mit Mineralsalzlösung sterilisiert und mit einer Reinkultur geimpft. Die Schalen, deren obere Hälfte durch untergelegte sterile Watte etwas gehoben wurde, damit das Gas leichten Zutritt hatte, wurden unter Glocken gebracht, die gegen die Außenluft durch Wasser abgesperrt wurden. Aus den 2 Liter fassenden Glocken wurden in einigen Fällen 400, in anderen 800 und 1000 ccm Luft abgesaugt und dafür reines Kohlenoxyd (aus Ameisensäure + konzentrierter Schwefelsäure) eingeleitet. Die Glocken waren graduiert, so daß die Abnahme des Volumens verfolgt werden konnte.

Nachdem auf den Doppelschalen deutliche Vermehrung eingetreten war (meist nach etwa 14 Tagen), setzte die Volumenabnahme lebhaft ein. Je mehr Luft vorhanden war (Sauerstoff), desto schneller war die Zersetzung beendet. Bei einer wirksamen Oberfläche der Doppelschalen von 12 cm Durchmesser, die mit dichten Inseln des Bazillus übersät waren (Wachstum etwa 3 Wochen), wurden die Gasgemische etwa in folgenden Zeiten restlos verbraucht:

(Endpunkt der Zersetzung: Palladiumchlorürreaktion negativ.)

1.	400 ccm	CO + 1600 ccm	Luft,	verschwunden	in	12	Tagen
2.	400 „	CO + 1600 „	„	„	„	17	„
3.	400 „	CO + 1600 „	„	„	„	11	„
4.	800 „	CO + 1200 „	„	„	„	21	„
5.	800 „	CO + 1200 „	„	„	„	26	„
6.	1000 „	CO + 1000 „	„	„	„	35	„
7.	1000 „	CO + 1000 „	„	„	„	42	„

Bei allen Versuchen[1]) wurde Absorption von *Kohlensäure* im Sperrwasser durch dicke Niederschläge mit Kalkwasser festgestellt. Die quantitative Bestimmung unterblieb, da ein großer Teil der gebildeten Kohlensäure durch das Sperrwasser in die Luft entweichen kann und die Zahlen daher unzureichend würden, sie verlangt eine andere Sperrflüssigkeit oder völlig abgeänderte Versuchsanordnung[2]). Auch hier zeigte das Sperrwasser der Glocken, die zur Kontrolle nicht mit Bakterien beschickt wurden, nur die leichte Trübung mit Kalkwasser, die durch die Kohlensäure der Luft veranlaßt wird.

Gesteigert wird die Schnelligkeit der Reaktion noch, wenn die Bakterien in stärkerer Verteilung mit dem Kohlenoxydluftgemisch in Berührung kommen. Töpfe mit sterilisierter *Erde* wurden mit einer Aufschwemmung der Bakterien getränkt und dann unter sonst gleichen Bedingungen unter Glocken in verschiedenen Kohlenoxydkonzentrationen kultiviert. In einem Falle wurden 400 ccm Kohlenoxyd bei Gegenwart von 1600 ccm Luft in 9 Tagen restlos oxydiert (20°, Lichtzutritt). Auf den Erdtöpfen siedelten sich überall die typischen kleinen schneeweißen Kolonien an.

Der *Bac. oligocarbophilus* ist demnach auch in Reinkultur nicht nur in der Lage, das Kohlenoxyd zu seinem organischen Aufbau zu verwenden, sondern vermag dasselbe auch in großen Mengen zu Kohlensäure zu verbrennen. Kohlenoxyd dient den Mikroben sowohl als Kohlenstoff- wie auch als Energiequelle, ob es als CO direkt verwertet

---

[1]) Ähnliche Versuche mit feuchter Erde siehe bei *C. Wehmer* (23).

[2]) Geeignete Apparatur fehlte dem Laboratorium, ich mußte mich also mit der rohen Methode behelfen.

wird oder erst nach Übergang in CO_2, bleibt zunächst offen. In letzterem Falle lägen die Verhältnisse ähnlich wie bei Wasserstoff-, Salpeter- und anderen prototrophen Bakterien. Auch bezüglich des *Methans* ist diese Frage bekanntlich noch offen.

c) Einfluß des Lichtes auf die Oxydation.

Es wurde eine Reihe von Versuchen angestellt, den Einfluß des Lichtes auf den Oxydationsprozeß zu untersuchen. Alle in dieser Richtung sowohl mit Erde als auch mit Reinkulturen gemachten Versuche verliefen insofern ohne bestimmtes Resultat, als die Ergebnisse ständig variierten. Bald verlief der Prozeß unter sonst völlig gleichen Bedingungen bei Lichtzutritt, bald dagegen im Dunkeln schneller. Auf Grund zahlreicher Versuche scheint es mir, daß zerstreutes Tageslicht auf die Oxydation wie auf die Schnelligkeit derselben *keinen* Einfluß hat.

d) Verbreitung der Kohlenoxydbakterien.

Knallgasbakterien sind bekanntlich überall in den oberen Erdschichten, und zwar in zahlreichen Arten vertreten; aus Erdproben verschiedener Herkunft wurden nach Feststellung von *Grohmann* (6) und *Ruhland* (20) fast jedesmal neue Stämme isoliert. Zur Feststellung, ob auch die Kohlenoxydbakterien allgemein verbreitet sind, und ob es neben der oben isolierten Form in anderen Erdböden vielleicht noch andere Arten gibt, wurden aus der Umgebung Hannovers Böden verschiedener Art in dieser Richtung untersucht.

14 große Gärkölbchen nach *Einhorn* wurden wie üblich mit mineralischer Nährlösung beschickt, sterilisiert und mit 20 ccm CO und 30 ccm O_2 (O-Überschuß) beschickt. Beimpft wurden je zwei Kölbchen mit Material verschiedenster Herkunft, und zwar:

1	und	2 =	Gartenerde,	9	und	10 =	Blumenerde,
3	„	4 =	Grabenschlamm,	11	„	12 =	Ackerboden,
5	„	6 =	Wiesenerde,	13	„	14 =	steiniger Gebirgsboden.
7	„	8 =	Jauche,				

Schon nach 8 Tagen war der Kohlenoxydverbrauch in den Kölbchen ein sehr verschiedener. *Jauche* und *der Steinboden* oxydierten nur langsam, schnell dagegen die *Gartenerde*, jedoch mag das mehr oder weniger Zufall sein. Jedenfalls waren in allen untersuchten Proben Kohlenoxydbakterien vorhanden. Nach 3 Wochen (alle Kölbchen zeigten Wachstum auf dem äußeren Schenkel) wurden die jungen Häute auf neue Lösung übergeimpft und unter gleichen Bedingungen nochmals kultiviert, dann wurden Platten mit mineralischem Agar gegossen und in *Kohlenoxyd-Sauerstoffatmosphäre* unter der Glocke kultiviert. Auf allen Platten zeigte sich üppiges Wachstum, doch stets konnte nur *eine*

Form isoliert werden, die von Kohlenoxyd zu leben vermochte, und zwar der *Bac. oligocarbophilus*.

Kohlenoxydbakterien sind anscheinend überall in den oberen Erdschichten verbreitet. Ob es neben dieser einen noch andere Arten mit gleicher Fähigkeit gibt, bliebe noch zu zeigen; möglich erscheint natürlich, daß andernorts noch weitere Formen aufgefunden werden können.

e) Optimaltemperatur für Wachstum und Wirkung.

Kaserer (10) deutet an, daß die beste Temperatur für das Wachstum des *Bac. oligoc.* bei 50 bis 55° liegt. Wenn *Kaserer* hier nicht andere Bakterien vor sich hatte, ist mir das unwahrscheinlich, es widerspricht meinen Erfahrungen. Bei meinen vielen Vorversuchen waren sowohl Wachstum wie Oxydationsleistung bei 50 bis 55° äußerst gering, gut dagegen bei Zimmertemperatur (± 20°). *Lantzsch* (11) gibt keine Angaben über seine Kulturtemperatur. Zur Bestimmung der Optimaltemperatur wurde mit Reinkulturen folgende Versuchsreihe aufgestellt:

Versuchsanordnung auch hier wieder Gärkölbchen in Minerallösung beschickt und mit Reinkulturen des *Bac. oligoc.* geimpft. Eingeleitet in den geschlossenen Schenkel 20 ccm CO und 30 ccm O_2, Temperaturen ± 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55 und 60°.

Die Versuchsreihe ergab, daß die Optimaltemperatur bei ± 30° liegt. Gutes Wachstum findet noch bei 20° statt. Bei 50° war es sehr träge, bei 60° gleich Null.

f) Oxydation von Wasserstoff durch Bac. oligoc.

Kaserer (10) isolierte den *Bac. oligoc.* aus *Wasserstoff* oxydierenden rohen Bakterienhäuten. Es gelang ihm aber nicht, die Reinkultur in Knallgasatmosphären zu ziehen, sondern er mußte denselben auf an der Luft kultivierten Platten rein züchten. Die erhaltene *Reinkultur* vermochte *nicht*, Knallgas zu oxydieren, stets ergab sich dasselbe Bild. Rohkulturen oxydierten lebhaft, Reinkulturen nicht. Mischte er die Reinkulturen mit Kulturen der ebenfalls isolierten, verunreinigenden Bakterien (meist Fluoreszenten), so oxydierte die Mischkultur manchmal Knallgas, manchmal nicht. *Kaserer* glaubte an eine Symbiose, stand aber dieser „Launenhaftigkeit“ des Bacillus ratlos gegenüber.

Lantzsch (11) nahm diese Versuche wieder auf und erhielt folgendes überraschende Resultat:

Bac. oligocarbophilus oxydierte Wasserstoff in nicht sterilisierter Lösung, dagegen nicht in steriler Lösung. Münchener Leitungswasser mit Zusatz von 0,01 Proz. K_2HPO_4 und 0,01 Proz. $NaNO_3$ oxydierte schon unbeimpft Knallgas. Der Schluß daraus: Im Leitungswasser befindet sich eine Bakterie, die Knallgas zu oxydieren vermag, wenn ihr die zum Wachstum nötigen Salze gegeben werden. Der Verfasser glaubt, in diesem Befund eine Bestätigung der Ergebnisse *Kaserers* zu finden (daß Rohkulturen oxydieren, Reinkulturen nicht). Ganz so leicht scheint die Aufklärung der Widersprüche jedoch nicht zu sein, denn in der Nährlösung kann die Species, die nach Ansicht von *Lantzsch* Träger der oxydierenden Wirkung sein soll, nicht als Verunreinigung gewesen sein, da *Kaserer* erstens kein Leitungswasser verwandt hat, zweitens seine Nährlösung auch sterilisierte. Unbeimpfte Kontrollversuche haben ja dann tatsächlich auch ein negatives

Resultat ergeben. Daß die wirksame Art mit der Erde übergeimpft wurde, erscheint ebenso ausgeschlossen, da *Kaserer* sämtliche verunreinigenden Begleiter des *Bac. oligoc.* ebenfalls isoliert und auf Verhalten gegen Knallgas geprüft hat, und zwar mit negativem Erfolg.

Es erscheint also interessant, über diese strittige Frage der Wasserstoffoxydation Versuche anzustellen, zumal ich auch aus meinen Rohkulturen der Knallgasbakterien den *Bac. oligoc.* isolieren konnte. Die Schwierigkeiten, welche *Kaserer* bei der Reinzucht in Knallgasatmosphäre hatte, treffen allerdings für meine Isolierung nicht zu, da, wie schon früher gezeigt wurde, der Bazillus sich auf Mineralagar in Knallgas leicht rein ziehen läßt.

Es wurde sowohl der aus *Knallgasrohkulturen* als der aus *Kohlenoxydkulturen* erhaltene *Bac. oligocarbophilus* in Reinkultur auf sein Verhalten gegen Knallgas geprüft. Sieben *Einhorn*sche Gärkölbchen wurden mit der mineralischen Nährlösung beschickt, mit Watte verschlossen und durch dreimaliges Dämpfen bei 100° sterilisiert. Drei Kölbchen beimpfte ich mit Reinkulturen des *Bac. oligoc.* aus Knallgashäuten, drei mit derselben Bakterie aus Kohlenoxydhäuten, ein Kölbchen blieb zur Kontrolle steril. Darauf wurden in den geschlossenen Schenkel aller sieben Kölbchen 50 ccm Knallgas und einige Kubikzentimeter Kohlensäure eingeleitet. (Lichtzutritt, 30°.)

Zuerst nahm das Volumen aller sieben Kölbchen ziemlich gleichmäßig und langsam ab (wohl infolge Löslichkeit der CO_2), vom dritten Tage ab zeigte das Kontrollkölbchen konstantes Volumen, während die beimpften sechs Kölbchen weiter abnahmen, und zwar äußerst rapide. Das Resultat war überraschend, da die Oxydation des Wasserstoffs schnell und ohne Schwierigkeiten vonstatten ging. Nach wenigen Tagen war das Knallgas verschwunden und eine üppige Vegetation des *Bac. oligoc.* vorhanden. Die Versuche wurden mehrfach wiederholt mit Kulturen, an deren Reinheit nicht zu zweifeln war; stets oxydierte die Bakterie lebhaft Wasserstoff. Unter großen Glocken, die mit Knallgas und Kohlensäure beschickt waren, zeigte sich in Doppelschalen (Minerallösung mit Reinkulturen beimpft) nach 8 bis 10 Tagen ein so starkes Wachstum, daß 500 ccm Knallgas in wenigen Tagen verbrannt wurden. Auf der Flüssigkeit siedelten sich stets die typischen, trocknen, schneeweißen Inseln von fast pilzartigem Aussehen an, deren mikroskopisches Bild das bekannte war (unbewegliche, sporenlose Stäbchen). Zur Kontrolle, ob nicht doch noch ein anderes Wasserstoff oxydierendes Agens da war, wurden von den Inseln Platten gegossen und in Knallgas kultiviert, die Kulturen waren aber noch absolut rein, die Platten zeigten nur die weißen Kolonien des *Bac. oligoc.*

Die Oxydation des Wasserstoffs gelang so auffallend gut und schnell, daß die Schwierigkeiten, die *Kaserer* hatte, sowie der negative

Befund von *Lantzsch* mir nicht recht verständlich sind. Es könnte vielleicht nur die Vermutung aufkommen, daß es sich um verschiedene Bakterien handelt, wie weiter hinten bewiesen wird, ist dies aber nicht der Fall.

Durch Versuche ist also eindeutig festgestellt, daß der *Bac. oligocarbophilus Beijerinck* und *van Delden* nicht nur in Rohkultur, sondern auch in *Reinkultur* Wasserstoff zu oxydieren vermag.

g) Anaerobe Oxydation des Kohlenoxyds.

Wie oben gezeigt, geht die Oxydation des Kohlenoxyds um so schneller vonstatten, je mehr Sauerstoff zugeführt wird. Trotzdem ergaben auch Versuche, in denen reines Kohlenoxyd ohne Sauerstoff geboten wurde, ein positives Resultat, allerdings in erheblich längerer Zeit. Es handelt sich hier natürlich nicht um eine streng anaerobe Oxydation, denn Sauerstoff kann aus der Luft ständig durch das Sperrwasser in den Versuch diffundieren. Zur *anaeroben* Oxydation bedarf es dazu einer besonderen Apparatur.

Auch über diese anaerobe Oxydation des Kohlenoxyds widersprechen sich die Angaben der Literatur. Angeregt durch die Erfolge *Beijerincks* (2), der eine Mikrobe auffand, welche elementaren Schwefel zu Sulfat oxydieren kann auf Kosten des aus einem Nitrat (unter Abspaltung von Stickstoff) entnommenen Sauerstoffs, versuchte *Kaserer* (10) auch eine anaerobe Oxydation von Wasserstoff und Kohlenoxyd. In Frage kamen für die Reduktion hauptsächlich die stark exothermen Prozesse der Denitrifikation, der Sulfatreduktion und der Reduktion von Ferriverbindungen. *Kaserer* gelang es nicht, eine anaerobe Oxydation der beiden Gase zu erzielen.

Während *Kaserers* Angaben betreffs der anaeroben Wasserstoffoxydation schon von *Niklewski* (16) widerlegt wurden, erhielt *Wehmer* (23) auch eine anaerobe Oxydation von Kohlenoxyd. Der Sauerstoff wurde hier durch Reduktion von Sulfaten gewonnen. *Wehmer* oxydierte Kohlenoxyd durch Topferde unter Glocken, die mit Wasser gegen die Außenluft abgesperrt wurden. Kohlenoxyd wurde zersetzt. Sperrwasser und Topferde schwärzten sich unter Entwicklung von Schwefelwasserstoff durch ausgeschiedene Schwefeleisen. Es handelte sich also offenbar um eine Reduktion von Sulfaten, besonders Eisensulfat, die mit der Oxydation des Kohlenoxyds Hand in Hand ging.

Wie oben schon erwähnt, geht die Oxydation auch ohne besonderen Sauerstoffzusatz vor sich, sofern der Luftsauerstoff durch das Sperrwasser Zutritt hat. Die Versuche wurden daher in gleicher Weise wiederholt. Das Resultat bestätigte völlig den Befund von *Wehmer*. Da es an den zur Kultur der Anaerobier nötigen Apparaten fehlte, wurde eine verhältnismäßig primitive Versuchsanordnung gewählt, die aber dennoch zuverlässig genug war.

Um den Luftsauerstoff sicher auszuschließen, wurde das Sperrwasser mit einer dicken *Ölschicht* bedeckt. Bei einigen Versuchen wurde auch, um der Reduktion entgegenzukommen, die Erde mit einer Lösung von Sulfaten, besonders *Eisensulfat* getränkt. Trotz Abschluß der

*



atmosphärischen Luft wurde in allen Versuchen das Kohlenoxyd oxydiert, und zwar in den künstlich mit Sulfaten angereicherten besonders schnell. Die Oxydation von 2000 ccm reinem CO ohne Zusatz von Sauerstoff dauerte im Mittel 2 bis 3 Monate. Wurde Sulfat zugesetzt, war die Oxydation meist schon nach 6 bis 8 Wochen beendet. Auch bei diesen Versuchen fand Ausscheidung von Schwefeleisen und Schwefelwasserstoff statt. Daß es sich tatsächlich um eine Oxydation handelt, nicht etwa um eine andere Umsetzung von Kohlenoxyd mit Reduktionsprodukten der Sulfate, wurde durch die Fällung beträchtlicher Mengen von Kohlensäure in der Sperrflüssigkeit bewiesen.

Wer die Träger der Sulfatreduktion sind, konnte nicht sicher festgestellt werden. *Wehmer* sah auffällig große Bakterienformen (Stäbchen von 10 μ Länge und Spirillen bis 20 μ lang), es gelang mir aber nicht, diese Arten zu erhalten und sie in Reinkultur auf ihr Verhalten gegen Kohlenoxyd zu prüfen. Es handelt sich hier vielleicht um eine Symbiose von Sulfat reduzierenden Bakterien [*Beijerinck* (3) kultivierte solche] mit dem *Bac. oligocarbophilus*, der aus den Kulturen leicht zu isolieren war. Meine Versuche, mit *Reinkulturen* des *Bac. oligoc.* Kohlenoxyd anaerob zu oxydieren, schlugen fehl.

h) Morphologisches und Physiologisches.

Der *Bac. oligocarbophilus* ist nach Angaben seines Entdeckers *Beijerinck* (1) ein unbewegliches, sporenloses Stäbchen von 0,5 . 0,5 bis 4 μ, makroskopisch kenntlich an den schneeweißen, trockenen Häuten auf flüssigem Substrat. Der von mir isolierte Bazillus gleicht äußerlich durchaus dem *Beijerincks*, auch er wächst in trockenen, schwierig benetzbaren, schneeigen Auflagerungen. Das mikroskopische Bild zeigt gleichfalls ein unbewegliches, sporenloses Stäbchen von 0,5 bis 0,8 . 0,8 bis 4 μ.

Kaserer (10) gibt keine genaueren Daten über Aussehen und Größe des Bac. oligoc.; *Lantzsch* (11) gibt an, daß er stets, auch in Reinkultur, überwiegend zwei Formen unterschied, eine *fädige* Wuchsform und eine *kokkenartige*. Auf Grund einiger Versuche mit verschiedenen Kohlenstoffquellen in gasförmigen Zustande glaubte der Verfasser einen gesetzmäßigen Wechsel zwischen diesen beiden Formen feststellen zu können. In der fädigen Wuchsform soll der Organismus *Kohlenoxyd*, in seiner Form als kokkenartiges Kurzstäbchen dagegen organische C-Verbindungen (Ameisensäure, Formaldehyd, Essigsäure, Aceton, Buttersäure) assimilieren können. Wegen der fädigen Wuchsform, bei der *Lantzsch* sogar echte Verzweigung sah, nannte er die Mikrobe *Actinomyces oligocarbophilus*.

Meine Kulturen zeigten die Stäbchenform ebenfalls oft in Ketten oder Fäden angeordnet, jedoch waren dieselben so locker, daß sie meist schon beim Präparieren unter dem Mikroskop auseinanderfielen. Echte Verzweigung wurde nie beobachtet, so daß ich auch den Namen *Bacillus oligocarbophilus* beibehielt.

Im übrigen bestätigte sich der Befund von *Lantzsch*, die Bakterie trat auch in meinen Kulturen stets überwiegend in jenen zwei Formen auf. Während *Beijerinck* überwiegend die Kokkenform sah, hatte ich meist

Stäbchen (Abb. 4.) Einen Einfluß der Ernährung auf die Form konnte ich nur insofern feststellen, als bei *autotropher* Ernährung (in *Kohlenoxyd-* oder in *Knallgas-Kohlensäureatmosphäre*) die *Stäbchenform* weitaus überwog, bei *heterotropher* Ernährung oder bei Wachstum auf Böden saurer Reaktion — beides sagt der Bakterie nicht zu — dagegen die *kokkenartigen* Kurzstäbchen. Die normale Wuchsform scheint also das Stäbchen zu sein, das stets bei guter Vegetation auftritt. Wachstum und Oxydation finden am besten bei autotropher Ernährung auf schwach alkalischem Boden statt (K_2HPO_4!).



Abb. 4. B. oligoc. 1 : 1000.

Die chemische Wirkung wird durch die Form nicht beeinflußt. Beide Formen greifen sowohl *Kohlenoxyd* als auch *Wasserstoff* an.

Da die aliphatischen Stoffe, die *Lantzsch* dem *Bac. oligoc.* als C-Quelle bot, in der gegebenen geringen Konzentration wohl auch für andere Bakterien als Nährstoff in Frage kommen können, ist die absolute Reinheit der Kulturen, die derselbe vor sich hatte, kaum bewiesen. Die Annahme, daß die Kulturen verunreinigt sind, widerlegt er lediglich durch die Tatsache, daß seine beiden Formen Volutin führen, grampositiv und säurefest sind.

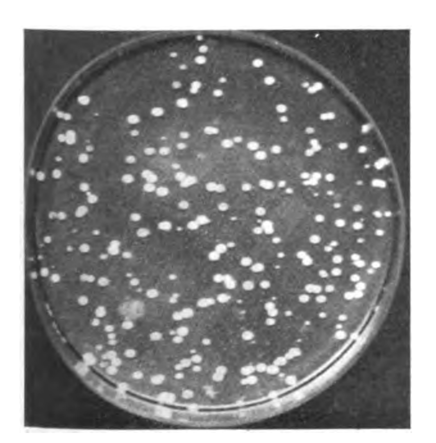


Abb. 5.
Plattenkultur des B. oligoc.

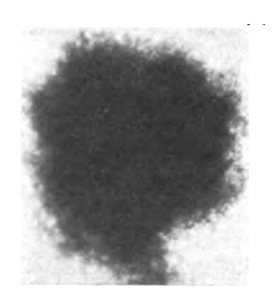


Abb. 6.
Kolonie des B. oligoc. 1 : 50.

Dieser Beweis genügt kaum, *Lantzsch* hat niemals einwandfrei in üblicher Weise Reinkulturen im Plattengießverfahren hergestellt, sondern bediente sich nur fraktionierter Aussaat. Ich habe deshalb in üblicher Weise zur Reinzucht Agarplatten gegossen (Abb. 5 u. 6). Von den gewachsenen Kolonien wurden zur Vorsicht nochmals Platten angelegt, die davon gemachten Abimpfungen haben ohne Zweifel den Anspruch, absolut rein zu sein. Aber auch hier war der Befund derselbe: *kokkenartige Kurzstäbchen* 0,5 bis 0,8 . 0,8 bis 1 μ, überwiegend dagegen Stäbchen 0,8 . 4 μ. Ganz vereinzelt alle Übergänge.

Wie schon erwähnt, ließ die auffällige Leichtigkeit, mit der der Bazillus Wasserstoff zu oxydieren vermochte, die Vermutung aufkommen, daß

nicht der *Bac. oligocarbophilus Beijerinck* und *van Deldens* vorlag. Makroskopisch und mikroskopisch waren die Bakterien hinreichend übereinstimmend. Eine Abweichung bestand nur darin, daß *Beijerincks* Mikrobe stets in dünnen, trockenen, zusammenhängenden *Häuten* wuchs, während meine das ausgesprochene Bestreben hat, trockene, schwierig benetzbare, schneeweiße *Inseln* zu bilden, die erst ganz allmählich die ganze Oberfläche überwuchern (Abb. 7). Um alle Zweifel auszuschalten, wurde die Form auch nach der Vorschrift von *Beijerinck* isoliert, also mineralische Lösung mit Erde infiziert und bei $\pm$ 25° an der Luft kultiviert. Nach mehr als 4 Wochen zeigte sich Hautbildung, welche durch Impfen auf frische Lösung möglichst gereinigt wurde. Dann wurden Agarplatten gegossen, und die so erhaltene Reinkultur erwies sich als völlig identisch mit der mir schon vorliegenden, so daß kein Zweifel besteht, daß tatsächlich der *Bac. oligocarbophilus* vorliegt.



Abb. 7.
Inseln des B. oligoc. auf Minerallösung.

Hervorgehoben sei hier noch, daß meine Bakterie nicht nur *autotroph* lebt, sondern auch *heterotroph* auf organischen Böden wächst, wenn auch nur kümmerlich. Von einer *giftigen Wirkung organischer Stoffe*, die schon in Spuren jedes Wachstum ausschalten, wie *Beijerinck* (1) und *Kaserer* (10) angaben, kann bei ihr nicht die Rede sein. Es wäre auch seine Vegetation im Erdboden nicht recht verständlich, da hier stets organische Stoffe vorhanden sind.

Am besten ist die Entwicklung autotroph auf mineralischem Nährboden in *Kohlenoxyd* oder *Knallgas*atmosphäre. Kohlenoxyd dient sowohl als Kohlenstoff wie auch als Energiequelle. Ob das Gas als solches assimiliert wird, steht dahin und bleibt noch zu beweisen. Das besonders gute Wachstums- und lebhafte Oxydationsvermögen in *Knallgas-Kohlensäureatmosphäre* erkläre ich hier dadurch, daß das aus der reduzierten Kohlensäure (Wasserstoffreduktion) entstehende Kohlenoxyd im status nascens besonders zusagt, zumal in der stark exothermen Reaktion der Knallgasverbrennung eine gute Energiequelle vorhanden ist. Durch die Bestätigung der Wasseroxydation könnte übrigens die Assimilationstheorie von *Kaserer* wieder einige Wahrscheinlichkeit gewinnen, nach der die Reaktion

$$H_2CO_3 + H_2 = CO + 2\,H_2O \quad 2\,CO + O_2 + 2\,H_2O = 2\,H_2CO_3$$

für den *Bac. oligocarbophilus* bezeichnend sein soll.

V. Zusammenfassung.

Leuchtgas und *Kohlenoxyd* werden bei Berührung mit feuchter humoser Erde oxydiert, wobei Bildung von Kohlensäure nachzuweisen ist. Träger der Wirkung sind in der Erde vorkommende Bakterien.

Für die Oxydation des Leuchtgases kommt nicht ein und dieselbe Bakterienart in Frage, es sind für die einzelnen Bestandteile des Gases

(Wasserstoff, Methan und Kohlenoxyd) verschiedene spezifische Bakterien wirksam. Aus Leuchtgaskulturen wurden *vier Stämme* isoliert, von denen drei bereits in der Literatur beschrieben sind. Die vierte Art konnte mit keiner bislang beschriebenen identifiziert werden. Isoliert wurden:

Bakterie Nr. 1 = *Bac. oligocarbophilus Beijerinck* und *van Delden,*
„ „ 2 = „ *methanicus Söhngen,*
„ „ 3 = „ *pantothrophus Kaserer,*
„ „ 4 = „ *X* (unbekannt).

Die Bakterie Nr. 1 oxydiert *Wasserstoff* und *Kohlenoxyd.* Nr. 2 oxydiert nur *Methan* und Nr. 3 und 4 nur *Wasserstoff.*

Bac. oligoc. ist allgemein in den oberen Bodenschichten verbreitet. Er lebt sowohl *autotroph* in *Kohlenoxyd* und *Knallgas-Kohlensäure-atmosphäre,* als auch *heterotroph* auf organischen Böden. Optimaltemperatur für Wachtum und Oxydationsvermögen liegt bei ± 30°.

Mikroskopisch zeigen Kulturen des *Bac. oligoc.* stets zwei Wuchsformen, *kokkenähnliche Kurzstäbchen* und deutliche *Langstäbchen.* Beide unbeweglich und sporenlos. Die erste Form überwiegt bei schlechter Ernährung, die zweite normale bei guter.

Die in der Erde vorkommenden Mikroorganismen, welche Kohlenoxyd *anaerob* zu Kohlensäure oxydieren, entnehmen den zur Oxydation nötigen Sauerstoff anscheinend der Reduktion von Sulfaten. An diesem Vorgang ist aber *Bac. oligoc.*, der in Reinkultur Kohlenoxyd nicht anaerob oxydieren kann, unbeteiligt.

VI. Literaturübersicht.

1) *Beijerinck* und *van Delden,* Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **10, 33,** 1903. — 2) *Beijerinck,* Zentralbl. f. Bakt. II, **11,** 594, 1904. — 3) *Derselbe,* ebendaselbst **1,** 1, 1895. — 4) *Biefel* und *Poleck,* Zeitschr. f. Biol. **16,** 279, 1880. — 5) *Bunte,* Journ. f. Gasbel. **28,** 644, 1885. — 6) *Grohmann,* Zentralbl. f. Bakt. II, **61,** 256, 1924. — 7) *Henriet,* C. r. **85,** 89 und 191, 1902. — 8) *Immendorf,* Landwirtsch. Jahrb. **21,** 281, 1892. — 9) *Kaserer,* Zentralbl. f. Bakt. II, **15,** 573, 1906. — 10) *Derselbe,* ebendaselbst **16,** 681 und 769 1906. — 11) *Lantzsch,* ebendaselbst **57,** 309, 1922. — 12) *Lebedeff,* Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **27,** 598, 1909. — 13) *Münz,* Dissertation Halle, 1915. — 14) *Nabokich* und *Lebedeff,* Zentralbl. f. Bakt. II, **17,** 350, 1907. — 15) *Niklewski,* ebendaselbst **20,** 469, 1908. — 16) *Derselbe,* Jahrb. f. wissensch. Bot. **48,** 113, 1910. — 17) *Derselbe,* Zentralbl. f. Bakt. II, **40,** 430, 1914. — 18) *Potain,* C. r. **126,** 938, 1898. — 19) *Ruhland,* Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **40,** 180, 1922. — 20) *Derselbe,* Jahrb. f. wissensch. Bot. **63,** 321, 1924. — 21) *Söhngen,* Zentralbl. f. Bakt. II, **15,** 513, 1906. — 22) *Spitta,* Chem. Centralbl. **1908,** I, 995. — 23) *Wehmer,* Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **59,** 887, 1926.

Über proteolytische Fermente im Serum.

VII. Mitteilung:

Die Bedeutung des Komplements bei der Blutgerinnung.

Von

Hans J. Fuchs und M. Frhr. v. Falkenhausen.

(Aus der Chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts und der Poliklinik der Medizinischen Klinik der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 27. Februar 1927.)

Die mannigfachen widerstreitenden Ansichten über den Vorgang der Blutgerinnung wurden durch die großzügigen Arbeiten *A. Schmidts*[1]) und seiner Schüler zu einer einheitlichen, neuartigen Form der Betrachtung geführt, und zwar war es die Erkenntnis des fermentativen Vorgangs, die den Grundstein für alle weitere Forschung über die Blutgerinnung legte.

Auf dieser Basis konnte dann neben *Fuld*[2]), *Spiro*[3]) u. a. namentlich *Morawitz*[4]) und seine Schule die Lehre von der Blutgerinnung zu den heute geltenden Anschauungen entwickeln, deren Grundlage auf Vorstellung von Fermentprozessen beruht, während *Wolf* auf der anderen Seite den Gerinnungsvorgang rein physikalisch-chemisch auffaßt.

Ein besonderes Verdienst von *Morawitz* ist es, den Begriff der Thrombokinase näher entwickelt zu haben. Mit dem Thrombogen soll diese eine Vorstufe des Thrombins das Prothrombin bilden, aus welchem die Kalksalze dann das Thrombin entstehen lassen.

Über das Thrombogen sind die Vorstellungen bis heute noch wenig geklärt. Bei eingehendem Studium der umfangreichen einschlägigen Literatur fiel uns jedoch auf, daß das Thrombogen eine ganze Reihe von Eigenschaften mit dem Komplement gemein hat. So wird nach *Bordet*[5]) das Thrombogen ebenso wie das Komplement durch Erhitzung auf 56° C zerstört. Andererseits wird auch durch Abkühlung auf 0° C, wie bekannt, sowohl die Blutgerinnung verzögert, wie auch die Komplementwirkung stark abgeschwächt. Eine Zerstörung beider Substanzen hat ferner der Zusatz von Bariumsalzen zur Folge [*von Dungern* und *Coca*[6])]. Auch

---

1) *A. Schmidt*, Zeitschr. f. Physiol. 1890 und „Blutlehre“. Leipzig 1892.
2) *Fuld*, Zentralbl. f. Physiol. 1903.
3) *Spiro*, Hofmeisters Ann. 5.
4) *Morawitz*, ebendaselbst 4; Arch. f. klin. Med. 1904 usw.
5) *Bordet* und *Delange*, Ann. inst. Pasteur 26, 657.
6) *v. Dungern* und *Coca*, Berl. klin. Wochenschr. 1907.

Magnesiumsulfat in starker Lösung verhindert die Blutgerinnung (*A. Schmidt*) und hemmt *rasch* die Komplementwirkung; bei entsprechender Verdünnung kehrt sowohl Gerinnungsfähigkeit als auch Komplementwirkung wieder zurück [*Noguchi*[1]), *Ruffer* und *Crendiropulo*[2])].

Eine besonders auffällige Analogie zeigen Komplement und Thrombogen in ihrem Verhalten gegenüber Kalksalzen; *Liebermann*[3]) konnte in vitro zeigen, daß lösliche Kalksalze nur in kleinen Dosen die Komplementwirkung fördern, in großen jedoch hemmen. Eine analoge Wirkung der Kalksalze auf die Geschwindigkeit der Entstehung des Fibrinferments (Thrombins) wies *Hammarsten*[4]) nach.

Eine weitere Parallele findet sich in Beobachtungen von *Wassermann*[5]) und *Bordet* und *Gengou*[6]). Letztere konnten feststellen, daß bei Behandlung von Meerschweinchen mit normalem Kaninchenserum das Serum derselben nach einigen Injektionen die Fähigkeit erlangte, die Koagulation des Kaninchenblutes zu sistieren, und zwar durch spezielle Einwirkung auf das Fibrinferment, nicht auf das Fibrinogen. *Wassermann* beobachtete, daß bei gleicher Behandlung die komplettierenden Eigenschaften des Serums schwankten bzw. herabgesetzt wurden.

Ein Mangel an Thrombogen im Blute liegt nach *Wohlgemuth*[7]) dann vor, wenn weder der Zusatz von Thrombokinase noch von Kalksalzen an der schlechten Gerinnbarkeit des Blutes etwas zu ändern vermag, sondern nur Zusatz von *frischem* Serum die Gerinnung erheblich fördert. Auch hierin liegt ein Hinweis auf eine gleichsinnige Wirkung von Komplement und Thrombogen. Es sei endlich noch bemerkt, daß es bis heute bei beiden Körpern noch nicht gelungen ist, sie in reiner Lösung herzustellen.

Wie das Komplement, so findet sich auch das Thrombogen nach dem Gerinnungsvorgang noch im Blutserum. Eine Quantitätsabnahme findet allerdings mit der Gerinnung auch beim Komplement statt; hierfür sprechen jedenfalls die Befunde von *Much*[8]) u. a., die beim Plasma stärkere bakterizide Eigenschaften als beim Serum feststellten.

Alle diese verwandten Eigenschaften vom Thrombogen und Komplement waren es — daneben jedoch auch die Vorstellung einer prinzipiellen Grundeinheit jeglicher Fermentwirkung im Organismus, auf die zahlreiche Ergebnisse unserer bisherigen Untersuchungen ebenso wie auch die Feststellungen anderer, z. B. *Galwialos*[9]), hinzuweisen scheinen —, die uns den Gedanken nahelegten, den Blutgerinnungsvorgang auf eine mögliche Beteiligung des Komplements hin zu untersuchen.

---

[1]) *Noguchi*, Centralbl. f. Bakteriol., Originalband **34**.
[2]) *Ruffer* und *Crendiropulo*, Soz. Biol. **60**.
[3]) *Liebermann*, Arch. f. Hyg. **62**.
[4]) *Hammarsten*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**. 98.
[5]) *Wassermann*, Zeitschr. f. Hyg. **37**.
[6]) *Bordet* und *Gengou*, Ann. inst. Pasteur **5**, 129; **17**, 128; **18**, 26 und 98.
[7]) *Wohlgemuth*, Grundriß d. Fermentmethod. Springer 1913.
[8]) *Much*, Münch. med. Wochenschr. 1908 und 1909.
[9]) *Galwialo*, diese Zeitschr. **177**, 266, 1926.

Die Auffassung des Komplements als eines fermentartig wirkenden Körpers wäre an sich keineswegs neu. *Ehrlich* faßte es geradezu als „Verdauungsferment" auf. Vieles spricht für seine Fermentnatur: zunächst teilt es deren Verhalten gegenüber Temperatureinflüssen. Bei 0° bzw. beim Gefrieren hält es sich lange. Beim Erhitzen auf 56° wird es zerstört; nur bei vorheriger Trocknung kann es Temperaturen um 100° aushalten. Alle diese Eigenschaften haben auch echte Fermente! Auch die Abhängigkeit der Komplementwirkung von der Reaktion und dem Salzgehalt des Wirkungsmilieus ist eine Eigenschaft, die es mit den Fermenten gemein hat. Salzfreie Lösungen inaktivieren beide; Zusatz von Ammoniumsulfat, Natriumsulfat und Calciumchlorid erhöhen bei beiden die Inaktivierungstemperatur [*Buchner*[1])] und gestalten die Wirkung kräftiger.

Demgegenüber sind die Momente, die gegen die Fermentnatur des Komplements zu sprechen scheinen, zum Teil nicht als ganz vollwertig anzusehen. In erster Linie wird als Gegengrund angeführt, daß das Komplement bei seiner Tätigkeit verschwindet bzw. abnimmt, während die hervorstechende Eigenschaft des Ferments gerade die ist, daß es hierbei erhalten bleibt. Es wäre jedoch denkbar, daß die Komplementabnahme nicht in direkter Beziehung zu seiner Wirkung steht [*Liefmann* und *Cohn* [2])] bzw. auf seiner Zerstörung durch Prozesse, die die Folge seiner Wirkung sind, beruht. Derartige Vorgänge werden von *Euler*[3]) erwähnt und sind von *Rusznyak*[4]) auch bei echten Fermenten beobachtet worden. Durch Dialyse oder durch Einleiten von Kohlensäure läßt sich eine nachweisbare Zerlegung des Komplements in Teilstücke erzielen, die getrennt voneinander wirkungslos sind und nur nach Wiedervereinigung die typische Wirkung zu entfalten vermögen. Auch echte Fermente sind zwar zerlegungsfähig, doch vermögen hier auch die einzelnen Komponenten getrennt zu wirken. Hier ergibt sich also ein anscheinender Unterschied, der allerdings nach den neuesten Untersuchungen von *Galwialo*[5]) verschieden ausgelegt werden kann. Jedenfalls unterliegt es keinem Zweifel, daß das Komplement wesentliche Eigenschaften echter Fermente besitzt, so daß a priori die Möglichkeit seiner Beteiligung an der Blutgerinnung nicht von der Hand gewiesen zu werden braucht.

In der Literatur finden sich bei aufmerksamer Durchforschung nach dieser Richtung hin eine große Anzahl von Tatsachen, die sich im Sinne einer Beziehung zwischen Komplement und Blutgerinnungsdauer verwerten lassen. Derartige unbewußte Hinweise enthalten die verschiedensten, auf die Lösung anderer Fragen abzielenden Arbeiten. *Klopstock*[6]) z. B. erwähnt, daß die Hinfälligkeit der Komplementwirkung des Serums offenbar durch den Gerinnungsprozeß bedingt sei. Andererseits bleibt in steril aufbewahrtem Citratplasma das Komplement 4 bis 8 Wochen wirksam. *Ehrlich* und *Morgenroth*[7]) fanden bei phosphorvergifteten Hunden, bei denen die Blutgerinnung verzögert war, einen Komplementsturz, der von *Bergmann*

---

[1]) *Buchner*, Arch. f. Hyg. 10.
[2]) *Liefmann* und *Cohn*, Zeitschr. f. Immunf. 7.
[3]) *Euler*, Chem. d. Enzyme I, Bergmann 1920.
[4]) *Rusznyak*, Zeitschr. f. Immunf. 8.
[5]) *Galwialo*, l. c.
[6]) *Klopstock*, Zentralbl. f. Bakt. Orig. I, 98.
[7]) *Ehrlich* und *Morgenroth*, Berl. klin. Wochenschr. 1900.

und *Savini*[1]) auf die Bildung komplementbindender Antikörper in der Leber zurückgeführt wird. Ähnliche Feststellungen machte *Dick*[2]) bei der Chloroformvergiftung. *Friedberger* und *Seelig*[3]) fanden am entleberten Frosch, *Nolf*[4]) sowie *Müller*[5]) am entleberten Kaninchen die Symptome des Komplementsturzes bzw. -schwundes. Diese Befunde wurden von *Rosenthal, Melchior* und *Licht*[6]) am leberlosen Hunde nachgeprüft. Sie fanden auch hier nach der Leberexstirpation ein starkes Abfallen des Komplementspiegels im Blute. Gleichzeitig wurde eine starke Herabsetzung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes beobachtet. Allerdings wurden diese beiden Phänomene von den Autoren nicht in Beziehung zueinander gebracht. Die Verzögerung der Blutgerinnung erklären sie vielmehr hauptsächlich durch die Feststellung eines Fibrinogenmangels nach der Leberexstirpation. Jedoch fanden sie auch beim Fibrinferment des Blutes ein Absinken.

Eine Gerinnungsverzögerung des Blutes Ikteruskranker ist lange bekannt. Abgesehen davon, daß bei derartigen Leberschädigungen ebenso wie bei der Leberentfernung mit einem *direkten oder indirekten* Komplementschwund zu rechnen ist, der in Beziehung zur verzögerten Blutgerinnung gebracht werden könnte, mag auch darauf hingewiesen werden, daß z. B. nach *G. Bayer*[7]) bei einer Kupplung gallensaurer Salze an Eiweißkörper Komplement gebunden wird. Die Injektion von gallensauren Salzen wirkt aber — wie andererseits festgestellt wurde — auch gerinnungshemmend [*Morawitz*[8]), *Popielski*[9])].

Das Komplement wird ferner durch eine Anzahl korpuskulärer Elemente in feiner Suspension, wie z. B. Aleuronatbrei, Hefezellen, zertrümmerte Organzellen [*Wilde*[10]), *Hocke*[11])], ferner durch Kaolin, Wittepepton und anderes adsorbiert. Bei den meisten dieser Substanzen ist als Folge ihrer Anwesenheit im Blute Hemmung oder Aufhebung der Gerinnungsfähigkeit nachgewiesen. Die letztere Eigenschaft besitzt ferner im höchsten Grade das Kobragift; gleichzeitig wirkt es auch antikomplementär.

In seiner stark gerinnungshemmenden Wirkung besonders bekannt und benutzt ist das Hirudin, der wirksame Bestandteil des Extrakts aus Blutegelköpfen. *Doyon*[12]) nimmt für das Hirudin denselben Antikörper an, wie ihn nach *Nolf*[13]) und *Doyon* die Leber produziert und in das Blut abgibt. Nach *Mellanby*[14]) enthält Hirudin sowohl Antithrombase als auch Antikinase. *Gratia*[15]) fand, daß eine Mischung von entsprechenden Mengen Hirudin und Thrombin nach tagelangem Stehen keine Hirudinwirkung

[1]) *Bergmann* und *Savini*, Zeitschr. f. exper. Pathol. **4**.
[2]) *Dick*, Infekt. Dis. **12**, 111.
[3]) *Friedberger* und *Seelig*, Zentralbl. f. Bakt. **46**.
[4]) *Nolf*, Bull. de l'acad. des sciences 1908.
[5]) *Müller*, Zentralbl. f. Bakt. **57**.
[6]) *Rosenthal, Melchior* und *Licht*, Arch. f. exper. Pathol. **115**.
[7]) *G. Bayer*, diese Zeitschr. **13**.
[8]) *Morawitz* und *Bierig*, Arch. f. exper. Pathol. **56**.
[9]) *Popielski*, Zeitschr. f. Immunforsch. 1913.
[10]) *Wilde*, Arch. f. Hyg. **44**.
[11]) *Hocke*, Zeitschr. f. Bakt. **34**.
[12]) *Doyon*, Journ. de physiol. Pathol. XIV.
[13]) *Nolf*, Ergebn. d. inn. Med. X.
[14]) *Mellanby*, Journ. of Physiol. **38**.
[15]) *Gratia*, C. r. **88**.

zeigt. Erhitzt man jedoch die Mischung auf 56°, so wird das Hirudin wieder wirksam. In Hinsicht auf eine mögliche Beteiligung des Komplements bei der Blutgerinnung ist diese Beobachtung von großer Wichtigkeit.

Den deutlichsten Hinweis auf eine Beziehung des Komplements zur Blutgerinnung finden wir endlich im anaphylaktischen Schock. Daß bei demselben eine verzögerte Blutgerinnung auftritt, war bereits den ersten Beobachtern, *Biedl* und *Kraus*[1]), bekannt. Sie nahmen als Ursache den Eintritt einer gerinnungshemmenden Substanz aus der Leber in die Blutbahn an. *Sirensky*[2]) betrachtete eine Verminderung sowohl von Fibrinferment als auch von Fibrinogen als Ursache der Gerinnungsverzögerung. *Friedberger* und *Hartoch*[3]) wiesen jedoch nach, daß im anaphylaktischen Schock eine akute, starke Komplementverarmung eintritt; an eine direkte Beziehung zur Blutgerinnungsverzögerung wurde jedoch von ihnen nicht gedacht. Daß das Komplement eine entscheidende Komponente bei der Erzeugung des anaphylaktischen Schocks ist, die dann eventuell in Parallele zu einer Beteiligung des Komplements bei der Blutgerinnung gesetzt werden könnte, ist zwar noch nicht ganz unumstritten. Dafür sprechen jedoch verschiedene bemerkbare Befunde. Nach Zufuhr hypertonischer Kochsalzlösung in die Blutbahn des sensibilisierten Tieres bleiben nach der Reinjektion die Schockwirkungen aus (*Friedberger* und *Hartoch*), was auf Unmöglichkeit der Komplementwirkung unter diesen Verhältnissen hinweist. Ferner tritt nach *Hartoch* und *Sirensky*[4]) bei trypanosomenkranken Meerschweinchen, die eine starke Komplementabnahme aufweisen, kein anaphylaktischer Schock auf. *Loeffler*[5]) endlich fand, daß der Schock ausbleibt, wenn man einem vorbehandelten Meerschweinchen vor der Reinjektion ein Komplement an sich reißendes hämolytisches System injiziert.

Demgegenüber wird von manchen Autoren der Komplementschwund als akzidentelle Erscheinung angesprochen, unter Hinweis darauf, daß keine Gleichzeitigkeit des Komplementminimums im Blute und des Schockmaximums zu bestehen braucht, und daß bei gewissen Antigenen, z. B. Hühnereiweiß, gar keine Komplementabnahme im Blute nachweisbar ist [*Loewit* und *Bayer*[6])]. Immerhin ist das Übergewicht der zugunsten eines Zusammenhangs von Komplementschwund und Gerinnungsverzögerung beim anaphylaktischen Schock sprechenden Tatsachen außerordentlich stark.

Im vorstehenden haben wir eine eingehende Würdigung sehr zahlreicher Momente, die für die Beteiligung des Komplements bei der Blutgerinnung sprechen, gebracht. Dennoch sind damit noch nicht alle Hinweise, die sich in der Literatur finden, erschöpft. Wir haben uns nur auf die Hauptsachen beschränkt; weniger beweiskräftige Hinweise sind in unsere Übersicht nicht aufgenommen worden; ohne Zweifel ist uns auch noch mancher bedeutungsvolle Hinweis entgangen. Immerhin dürften wir aus der kritischen Betrachtung des vorstehend angeführten Materials wohl die Berechtigung für uns schöpfen, den Versuch zu

[1]) *Biedl* und *Kraus*, Handb. d. Immunf., Jena 1909.
[2]) *Sirensky*, Zeitschr. f. Immunf. **12**.
[3]) *Friedberger* und *Hartoch*, ebendaselbst **3**.
[4]) *Hartoch* und *Sirensky*, ebendaselbst **12**.
[5]) *Loeffler*, ebendaselbst **14**.
[6]) *Loewit* und *Bayer*, Arch. f. exper. Pathol. **69**.

machen, die Beziehungen zwischen Komplement und Blutgerinnung zu untersuchen und der Klärung näherzubringen, zumal — wie eingangs gesagt — sich auch aus unseren fortlaufenden Untersuchungen über proteolytische Fermente einzelne Beobachtungen hervorhoben, die ebenfalls in Beziehung zu dieser Anschauung stehen und deren Einzelheiten in späteren Veröffentlichungen eingehend besprochen werden sollen.

Die zu wählende Versuchsanordnung ergab sich zunächst aus folgendem Gedankengange: Wenn das Komplement als integrierender Faktor der Blutgerinnung anzusehen ist, so muß völlige Komplementablenkung oder völliger Komplementverbrauch in vivo die Ungerinnbarkeit des nachher untersuchten Blutes zur Folge haben. Durch intravenöse Injektion eines hämolytischen Systems in ausreichender Menge mußte im tierischen Organismus ein Verschwinden des Komplements aus dem Kreislauf leicht zu bewirken sein.

Auf dieser Basis wurden an Meerschweinchen mehrere Versuche angestellt, die in Anlage und Resultat durch die folgenden Tabellen veranschaulicht werden.

Allerdings möchten wir noch bemerken, daß nicht alle Versuche bis zur vollständigen Ungerinnbarkeit des Blutes der mit dem hämolytischen System behandelten Tiere gekommen sind. Eine hochgradige Gerinnungsverzögerung war aber in *allen Fällen* festzustellen. Außerdem gingen einige Tiere infolge allzuhäufiger Herzpunktion mitten im Versuch ein. Außer den angeführten Versuchen sind aber noch weitere erfolgreiche zu verzeichnen gewesen.

Das hämolytische System wurde so hergestellt, daß eine 20proz. Aufschwemmung gewaschener Hammelerythrocyten 2 Stunden im Brutschrank mit der entsprechenden Menge Hammelblutambozeptor vom Kaninchen sensibilisiert wurde.

Für die überaus freundliche Überlassung beider Komponenten sprechen wir Fräulein *Margarete Stern*, der Leiterin der serologischen Abteilung der Hautklinik der Universität Breslau, unseren ergebensten Dank aus.

Von dem fertigen System wurde den Meerschweinchen, nachdem die Gerinnungszeit ihres Blutes vorher festgestellt worden war, intravenös in die freigelegte V. femoralis die angegebene Menge injiziert. Sofort nach der Injektion wurde die Hautwunde mit *Michel*schen Klammern verschlossen und das Tier entfesselt. Das in den angegebenen Zeitintervallen zur Bestimmung der Gerinnungszeit benötigte Blut wurde den Tieren durch Herzpunktion entnommen. Als Methode zur Zeitbestimmung der Gerinnung wurde die einfachste gewählt, da es von

vornherein klar war, daß nur *sehr große* Zeitunterschiede oder völlige Ungerinnbarkeit zur Feststellung verwendbarer Resultate in Betracht kamen. Zu diesem Zwecke wurde das entnommene Blut einfach in saubere Uhrschälchen aus der Spritze entleert. Durch sanftes Neigen der Schälchen und vorsichtiges, nicht zu häufiges Durchfahren des Blutes mit Glaskapillaren — eine Methodik, die eher beschleunigte Blutgerinnung herbeiführt als verzögerte! — wurde die Gerinnung kontrolliert.

Aus nachstehenden drei Versuchsreihen ergibt sich vollständig einwandfrei, daß durch dieses „Komplementabfangverfahren" eine erhebliche Verzögerung der Blutgerinnung bewirkt wird, die rasch zunimmt, ihren Höhepunkt in der vollkommenen Ungerinnbarkeit erreicht und dann wieder zum Normalwert zurückkehrt, der sogar noch etwas überschritten wird, da die Blutgerinnungszeit dann noch etwas kürzer ist als im normalen Zustande vor der Behandlung.

Versuch I.

Meerschweinchen, 335 g, erhält intravenös 2,0 ccm Ambozeptor-Hammelerythrocytengemisch.

Entnahmezeit	Blutgerinnungszeit	
	Beginn	Vollständig
Vor Injektion	2′ 30″	5′ 00″
Nach Injektion		
5 Minuten	5 00	7 00
10 „	6 00	10 00
30 „	18 00	22 00
60 „	ungerinnbar	
13 Stunden	12′ 00″	15′ 00″
20 „	2 00	5 00

Versuch II.

Meerschweinchen, 350 g, erhält intravenös 3,0 ccm Ambozeptor-Hammelerythrocytengemisch.

Entnahmezeit	Blutgerinnungszeit	
	Beginn	Vollständig
Nach Injektion		
5 Minuten	3′ 00″	4′ 30″
15 „	8 00	10 30
60 „	23 00	26 00
2 Stunden	ungerinnbar	
11 „	49′ 00″	unvollständig
16 „	13 00	16′ 00″
30 „	4 00	5 30
36 „	1 40	2 50

Versuch III. Drei Meerschweinchen.

A. 320 g, erhält 3,0 ccm gewaschene Hammelerythrocyten, 20 proz., intravenös.

B. 300 g, erhält 3,0 ccm Hammelblutambozeptor, 1:300 intravenös.

C. 315 g, erhält 3,0 ccm sensibilisierter Hammelblutkörperchen (Ambozeptormenge entsprechend unter B) intravenös.

Entnahmezeit	Blutgerinnungszeit					
	A.		B.		C.	
	Beg.	Vollst.	Beg.	Vollst.	Beg.	Vollst.
Vor Injektion	3′ 10″	3′ 50″	3′ 30″	4′ 00″	3′ 10″	3′ 40″
Nach Injektion						
5 Minuten	3 40	4 20	3 40	4 30	5 00	6 30
15 „	3 30	4 10	3 35	4 30	9 50	12 00
30 „	3 30	4 20	3 30	4 30	22 00	25 00
60 „	3 50	4 50	3 00	3 50	70 00	unvollst.
3 Stunden	3 10	3 45	3 25	3 55	ungerinnbar	
20 „	3 50	4 25	3 00	3 15	19′ 00″	22′ 00″
30 „	3 20	3 55	3 40	4 10	2 30	3 05

Diese Tatsache könnte sich unter Umständen mit der von *Sachs* u. a. festgestellten Beobachtung decken, daß Komplementschwund unter bestimmten Bedingungen fast immer von Komplementüberproduktion gefolgt ist.

Gleichzeitig konnte festgestellt werden, daß bei Zusatz von frischem, komplementhaltigem Meerschweinchenserum zu dem ungerinnbaren Blut immer rasche Gerinnung erfolgte.

Um den Beweis, daß die Gerinnungsverzögerung parallel dem Komplementschwund einhergeht, noch zu kräftigen, haben wir in einem weiteren Versuch Gerinnungszeit und Komplementmenge — gemessen am hämolytischen System — miteinander verglichen.

Versuch IV.

Meerschweinchen, 420 g, erhält 4,0 ccm Hammelerythrocyten-Ambozeptorgemisch intravenös.

a.

Entnahmezeit	Blutgerinnungszeit	
	Beginn	Vollständig
Vor Injektion	3′ 20″	3′ 55″
Nach Injektion		
10 Minuten	7 30	8 45
60 „	22 00	25 00
2 Stunden	66 00	unvollständig
$2^1/_2$ „	ungerinnbar	
4 „	„	
20 „	5′ 40″	6′ 45″
26 „	2 30	2 50

Bei allen Versuchen war übereinstimmend an der Farbe des Serums zu erkennen, daß gleichzeitig mit dem Beginn des Komplementschwundes Hämolyse in der Blutbahn des Versuchstieres eingesetzt hatte.

b.

	Vor Injektion	Nach Injektion						
		10 Min.	60 Min.	2 Std.	$2^1/_2$ Std.	4 Std.	20 Std.	26 Std.
$^1/_2$. 0,5 Meerschweinchenserum	kpl.	kpl.	m.	0	0	0	kpl.	kpl.
0,25 „	„	st.	Sp.	0	0	0	fkpl.	„
$^1/_{10}$. 0,5 „	„	m.	0	0	0	0	st.	„
0,25 „	„	0	0	0	0	0	st.	„

mit 0,81 proz. NaCl-Lösung auf 0,5 ccm verdünnt + 0,5 ccm Hammelerythrocyten mit Hammelblutambozeptor sensibilisiert, $^3/_4$ Std., 39° C.

Da außerdem noch die Möglichkeit bestehen konnte, daß die hämolysierten Hammelerythrocyten die Blutgerinnung beeinflussen, untersuchten wir das Verhalten des Blutes von Meerschweinchen, die mit hämolysierten Hammelerythrocyten in gleicher Weise behandelt waren, bezüglich Gerinnung und Komplementgehalt. Die Hammelblutkörperchen wurden mit Aqua dest. in 40 proz. Aufschwemmung gebracht und die hämolytische Flüssigkeit durch Zusatz des gleichen Volumens 1,7 proz. NaCl-Lösung isotonisch gemacht.

Versuch V.

Meerschweinchen, 400 g, erhält 4,0 ccm 20 proz. hämolysierter Hammelerythrocytenaufschwemmung in 0,85 proz. NaCl-Lösung intravenös.

a.

Entnahmezeit	Blutgerinnungszeit	
	Beginn	Vollständig
Vor Injektion	4′ 10″	5′ 00″
Nach Injektion		
10 Minuten	4 15	5 00
35 „	3 50	4 30
65 „	4 00	4 10
150 „	4 10	4 45

b.

	Vor Injektion	Nach Injektion			
		10 Min.	35 Min.	65 Min.	150 Min.
$^1/_2$. 0,5 Meerschweinchenserum . .	kpl.	fkpl.	kpl.	kpl.	kpl.
0,25 „ . .	„	kpl.	„	„	„
$^1/_{10}$. 0,5 „ . .	„	„	„	„	„
0,25 „ . .	„	„	„	„	„
0,15 „ . .	„	„	„	„	„

mit 0,85 proz. NaCl-Lösung auf 0,5 ccm ergänzt + 0,5 ccm Hammelerythrocyten (5 proz). mit Hammelblutambozeptor sensibilisiert, $^3/_4$ Std., 39° C.

Es zeigte sich also nicht der geringste Einfluß der hämolysierten Hammelerythrocyten auf die Gerinnungszeit und den Komplementgehalt des Blutes des behandelten Tieres.

Aus den vorliegenden Untersuchungen läßt sich nur der sichere Schluß ziehen, daß das Komplement ohne Zweifel *eine* Rolle bei der Blutgerinnung spielt. Welche Rolle, darüber läßt sich hiernach nichts Abschließendes sagen. Es bleibt u. a. noch die Frage zu klären, ob an der Thrombinbildung das ganze Komplement oder nur Teile desselben mitwirken. Weitere Arbeiten beschäftigen sich bereits mit diesem Problem.

Es soll hierbei auch noch festgestellt werden, ob das Komplement dem Serocym oder eine Komplementkomponente dem Proserocym *Bordets* entspricht, wofür sich mancher Anhaltspunkt zu ergeben scheint.

Die Verzögerung der Blutgerinnung kann von seiten des Komplements auf verschiedene Weise erreicht werden; das Komplement kann in seiner Funktion bei der Gerinnung durch Ablenkung, Vernichtung oder Verstopfung ausfallen. Daß die Blutgerinnungsverzögerung bei der Hämophilie durch eine dieser drei Modifikationen bedingt ist, muß als äußerst wahrscheinlich bezeichnet werden. Die Beschleunigung der Blutgerinnung beim Hämophilen durch Beifügung frischen fremden Serums, die auch therapeutisch ausgenützt wird, und andere Momente sprechen durchaus in diesem Sinne.

Die Beantwortung dieser Fragen ebenso wie die Klärung des Mechanismus der Gerinnungshemmung bei der Peptonvergiftung usw. behalten wir uns vor.



Über eine jodometrische Schnellmethode zur Bestimmung der Tyrosinase.

Von

Hugo Haehn und Jeannot Stern.

(Mitteilung aus dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin.)

(Eingegangen am 28. Februar 1927.)

Die beste Bestimmung der Tyrosinase ist zurzeit die von *Raper* und *Wormall*[1]) ausgearbeitete Methode, die auf einer exakten Messung des in dem Reaktionsgemisch übrig gebliebenen Tyrosins beruht. Man läßt das Enzym auf die Aminosäure einwirken und kontrolliert den Fortgang der Oxydation durch die Bestimmung des Tyrosingehaltes nach bestimmten Zeitintervallen. Die entnommene Probe wird in *saurer* Lösung aufgekocht zur Entfernung des entstandenen Melanins, dann läßt man das Filtrat in saurer Lösung zur Koagulation der letzten Reste des Pigments und seiner Zwischenprodukte *2 Tage* lang stehen, und bestimmt das unverändert gebliebene Tyrosin auf jodometrischem Wege nach der bekannten Bromid-Bromatmethode, nachdem die Probe noch *24 Stunden* in *alkalischer* Lösung gestanden hat. Diese umständliche Behandlung des Reaktionsgemisches vor der Bromierung ist notwendig, um alle bromadsorbierenden Substanzen außer Tyrosin zu entfernen. Es ist also nicht möglich, eine Tyrosinasebestimmung an einem Tage zu Ende zu führen. Diesem Übelstande abzuhelfen, haben wir versucht, die Koagulation und Entfernung der Pigmente und seiner Zwischenprodukte *durch Zugabe von Bariumchlorid* in stark alkalischer Sodalösung zu beschleunigen, was uns auch gelungen ist. Der Barium-phosphat-carbonat-niederschlag fällt alles Pigment mit aus, so daß ein klares Filtrat entsteht. Im übrigen richten wir uns nach der Vorschrift der genannten Autoren. Die Geschwindigkeitskonstanten, die nach

---

[1]) *H. S. Raper* und *A. Wormall*, Biochem. Journ. **17**, 454, 1923.

der Gleichung für monomolekulare Reaktionen berechnet wurden, zeigen, daß die Schnellmethode fast dieselben Resultate liefert wie die Originalmethode nach *Raper* und *Wormall.*

Methodik.

I. Erforderliche Lösungen.

1. Phosphatpufferlösung: m/15 KH_2PO_4, m/15 Na_2HPO_4.

Erforderlich sind die nach *Sörensens* Vorschrift gereinigten Salze. Die Lösungen, zu gleichen Teilen gemischt, geben ein $p_H = 6{,}81$.

2. Tyrosinlösung: 0,5 g Tyrosin in 500 ccm m/15 primäres Kaliumphosphat und 500 ccm m/15 sekundäres Natriumphosphat.
3. Essigsäure: 10proz.
4. Sodalösung: 10proz.
5. $BaCl_2$-Lösung: 10proz.
6. $NaBrO_3$-Lösung: (0,8502 g im Liter).
7. KBr-Lösung: 50proz.
8. KJ-Lösung: 10proz.
9. n/50 $Na_2S_2O_3$ (4,966 g im Liter).
10. Lösliche Stärke.
11. HCl: 20proz.

Darstellung des Enzymsaftes.

Kartoffelknollen werden gewaschen, in einer Reibemaschine zerkleinert, in einen Beutel gefüllt und ausgepreßt. Man läßt den Saft 15 bis 30 Minuten stehen und zentrifugiert die Stärke und die sonstigen Beimengungen ab. Auf die Tyrosinlösung bezogen, geben wir 10 Proz. Kartoffelsaft zu.

II. Ausführung des Oxydationsversuches (Kartoffelsorte unbekannt).

In einen Stehkolben von 500 ccm Inhalt bringt man 300 ccm Tyrosinlösung (s. I, 2), 30 ccm Kartoffelsaft und 10 ccm Toluol als Antisepticum und Schaumzerstörer (eventuell noch einige Tropfen Maschinenöl). Der Kolben wird mit einem Gummistopfen versehen, der eine Lüftungseinrichtung trägt, worauf man einen mit Wasserdampf und Toluol gesättigten Luftstrom durch das Reaktionsgemisch schickt. Der Kolben steht in einem Thermostaten von 20°. Ein Kontrollkolben mit 300 ccm Phosphatlösung (Lösung 1), 30 ccm Kartoffelsaft und 10 ccm Toluol dient zur Korrektur des Tyrosinwertes in bezug auf bromadsorbierende Substanzen des Enzymsaftes.

Bevor man jedoch mit der Lüftung der beiden Versuche beginnt, nimmt man aus jedem Kolben eine oder zwei Proben von je 20 ccm zur Bestimmung der Anfangskonzentration des Tyrosins. Man versetzt sie sofort mit 0,5 ccm 10proz. Essigsäure, kocht zur Zerstörung der

Enzyme und Ausfällung der Eiweißstoffe auf und läßt 10 Minuten lang stehen. Dann wird filtriert, der Melanin-Eiweißniederschlag zur Entfernung des anhaftenden Tyrosins dreimal mit heißem Wasser, dann mit 10 ccm 10proz. Sodalösung ausgewaschen. Man wartet, bis das ganze Waschwasser und die Sodalösung abgeflossen sind. Dann wird aufgekocht und die Probe mit 4 ccm 10proz. $BaCl_2$-Lösung versetzt. Nach dem Aufkochen wird filtriert und der Niederschlag zwei- bis dreimal mit heißem Wasser ausgewaschen. Jetzt werden 10 ccm 10proz. Essigsäure zugefügt und die Lösung wieder gekocht. Die Proben bleiben nun bis zur Abkühlung auf Zimmertemperatur stehen. Sind sie klar geblieben, so wird sofort zur Titration geschritten, anderenfalls muß noch einmal filtriert werden. Alle anderen nach bestimmten Zeitintervallen entnommenen Proben erfahren eine gleiche Behandlung. Die Sodazugabe bewirkt gewöhnlich eine starke Dunkelfärbung, die jedoch nach der $BaCl_2$-Behandlung vollständig verschwindet.

III. Die Bestimmung des übriggebliebenen Tyrosins $(a - x)$.

Man versetzt die Tyrosinlösung mit 10 ccm der Natriumbromatlösung, 2 ccm der 50proz. Kaliumbromidlösung und 7,5 ccm der 20proz. Salzsäure, verkorkt die Flasche und läßt 20 Minuten stehen[1]). Dann werden 2 ccm der 10proz. Jodkaliumlösung zugefügt und das freie Jod mit n/50 Natriumthiosulfat titriert.

IV. Die Berechnung.

1. Titerbestimmung der Natriumthiosulfatlösung.

10 ccm Natriumbromatlösung, gemischt mit 2 ccm der 50proz. und 7,5 ccm der 20proz. Salzsäure; dazu 2 ccm 10proz. Jodkaliumlösung.

Gef.: 10 ccm Natriumbromat → 16,5 ccm n/50 $Na_2S_2O_3$.

[1]) Gleichungen zur Erklärung des Reaktionsmechanismus (*E. Th. Miller*):

1. $NaBrO_3 + 5\,KBr + 6\,HCl = NaCl + 5\,KCl + 3\,Br_2 + 3\,H_2O$.

2. $C_6H_4\!<\!\begin{smallmatrix}OH\\CH_2.CH.NH_2.COOH\end{smallmatrix} + 2\,Br_2$

$\quad\rightarrow C_6H_2Br_2\!<\!\begin{smallmatrix}OH\\CH_2.CH.NH_2.COOH\end{smallmatrix} + 2\,HBr$.

3. Nach Gleichung (1) liefert ein Mol Natriumbromat 6 Atome Brom, nach Gleichung (2) entsprechen 4 Atome dieses Elements einem Mol Tyrosin. Folglich

$2\,NaBrO_3 \rightarrow 3$ Tyrosin

$302 : 543,4 = 0,8502 : x$

$x = 1,531$ g Tyrosin

0,8502 g Bromat im Liter, also 1 ccm = 0,001 53 g Tyrosin.



2. Titration des Tyrosins in den verschiedenen Proben.

Tabelle I.

$p_H = 6,8.$ $t = 20^0.$

Proben nach Minuten:	0 ccm $Na_2S_2O_3$	120 ccm $Na_2S_2O_3$	270 ccm $Na_2S_2O_3$	330 ccm $Na_2S_2O_3$
Schnellmethode nach *Haehn* und *Stern*.				
Kontrollprobe ohne Tyrosin I . .	13,9	13,8	13,7	13,8
Kontrollprobe ohne Tyrosin II . .	13,8	13,7	13,8	13,8
Hauptversuch I . .	4,45	9,8	12,20	12,75
Hauptversuch II . .	4,55	9,8	12,25	12,80
Methode nach *Raper* und *Wormell*.				
Kontrollprobe ohne Tyrosin I . .	14,2	13,7	13,7	13,7
Kontrollprobe ohne Tyrosin II . .	13,9	13,7	13,7	13,8
Hauptversuch I . .	4,80	9,6	12,40	12,9
Hauptversuch II . .	4,85	9,8	12,50	13,0

3. Berechnung des Tyrosinäquivalents aus der Bromadsorption der Kontrolle.

16,5 ccm $Na_2S_2O_3$ (Äquivalent für das zugegebene Br)
13,8 „ $Na_2S_2O_3$ („ „ „ wiedergefundene Br)

2,7 ccm $Na_2S_2O_3$ („ „ „ adsorbierte Br)

16,5 (ccm $Na_2S_2O_3$) : 10 (ccm $NaBrO_3$) = 2,7 : x
x = 1,63 (ccm $Na_2S_2O_3$)
1 (ccm $NaBrO_3$) : 0,001 53 (g Tyrosin) = 1,63 : x
x = 0,002 49 (Tyrosin-Äquivalent

4. Berechnung des Tyrosins im Hauptversuch.

Probe nach 0 Minuten.

16,50 ccm $Na_2S_2O_3$
4,50 „ $Na_2S_2O_3$

12,00 ccm $Na_2S_2O_3$

16,5 : 10 = 12 : x
x = 7,27 ccm $NaBrO_3$

1 : 0,00 153 = 7,27 : x
x = 0,0111

0,0111 g Tyrosin
0,0024 g Tyrosinäquivalent der Kontrolle

0,0087 g Tyrosin in 20 ccm der Probe
0,1435 g „ „ 330 „ des Reaktionsgemisches

Die anderen Proben nach 120, 270 und 330 Minuten werden analog berechnet.

Tabelle II.

$p_H = 6{,}8$. $t = 20^0$.

Proben nach Minuten:		0 a	120 (a — x)	270 (a — x)	330 (a — x)
Tyrosin in g in 330 ccm Reaktionsgemisch	A . . .	0,1435	0,0613	0,0244	0,0161
	B . . .	0,1375*)	0,0628	0,0207	0,0123
$k = \left(\frac{2,302}{t} \log \frac{a}{(a-x)}\right)$	A . . .	—	0,0070	0,0065	0,0066
	B . . .	—	0,0064	0,0069	0,0071

*) Es sei darauf hingewiesen, daß die experimentellen Befunde mit 16,5 multipliziert wurden, wodurch sich die Unterschiede in den Reihen A und B ergeben.

A sind die Werte des Schnellversuchs, B diejenigen der Methode nach *Raper* und *Wormall*. Die Tabelle II zeigt, daß die Konstanten k, nach der Formel für monomolekulare Reaktion berechnet, nach beiden Versuchsmethoden fast dieselben Werte ergeben. Ob die eine oder die andere richtigere Resultate gibt, kann nicht entschieden werden. Die Werte nach 0 Stunden sind bald nach der einen, bald nach der anderen Methode besser (s. auch Tabelle III).

Tabelle III.

$p_H = 6{,}8$. $t = 20^0$.

Proben nach Minuten:		0 a	120 (a — x)	240 (a — x)	300 (a — x)
Versuch mit Kartoffelsorte Beseler. 17. I. 1927.					
Tyrosin in g in 330 ccm Reaktionsgemisch	A. . . .	0,1226	0,0737	0,0483	0,0363
	B. . . .	0,1237*)	0,0670	0,0360	0,0280
$k = \left(\frac{2,302}{t} \log \frac{a}{(a-x)}\right)$	A. . . .	—	0,0047	0,0040	0,0041
	B. . . .	—	0,0049	0,0050	0,0048
Versuch mit Kartoffelsorte Beseler. 20. I. 1927. (3 Tage bei Zimmertemperatur gelagert.)					
Tyrosin in g in 330 ccm Reaktionsgemisch	A. . . .	0,1164	0,0445	0,0184	0,0123
	B. . . .	0,1331	0,0537	0,0242	0,0151
$k = \left(\frac{2,302}{t} \log \frac{a}{(a-x)}\right)$	A. . . .	—	0,0079	0,0076	0,0075
	B. . . .	—	0,0074	0,0071	0,0071

*) Fehler auch hier mit 16,5 multipliziert.

Die Versuche der Tabelle III bestätigen das obige Resultat. Nach beiden Vorschriften wird fast dieselbe Konstante gefunden. Die Bariumchloridmethode ist jedenfalls ihrer schnellen Handhabung halber der *Raper-Wormall*schen Originalmethode vorzuziehen, sobald sich auch bei anderen Reaktionsverhältnissen, anderen Enzymsäften, keine Nachteile zeigen sollten. Augenblicklich sind Versuche mit Rübensaft in Gang.

Nachtrag zur Abhandlung „Der Gaswechsel bei normalen und der großhirnhemisphärenberaubten Tauben“[1].

Von

O. Moltschanowa.

(Aus dem Institut für Ernährungsphysiologie des Volksgesundheitskommissariats in Moskau.)

(Eingegangen am 2. März 1927.)

In einem Briefe an Herrn Prof. *M. N. Schaternikoff* hat Herr Prof. *F. G. Benedict* die Liebenswürdigkeit gehabt, uns darauf aufmerksam zu machen, daß es unsererseits versäumt worden war, in der Abhandlung über Gaswechsel der Tauben die Versuchstemperaturen anzugeben. Dieses Versehen soll in folgenden Tabellen berichtigt werden.

Tabelle I.

Versuchsdaten 1925	Vers.-Temperat.		Versuchsdaten 1925	Vers.-Temperat.		Versuchsdaten 1926	Vers.-Temper.		Versuchsdaten 1926	Vers.-Temper.	
	zu Anfang	am Ende		zu Anfang	am Ende		zu Anfang	am Ende		zu Anfang	am Ende
1. X.	14,5	14,8	26. X.	15,4	16,0	23. I.	15,5	16,2	8. I.	16,1	16,6
5. X.	14.2	14,7	5. XI.	15.7	16,1	1925 17. XI.	14,67	15,9	11. I.	15,9	16,4
9. X.	14,4	15,0	9. XI.	15,9	16,4	9. XII.	15,9	16,1	13. I.	15,3	15,9
13. X.	14,5	15.2	11. XI.	15,8	16,4	15. XII.	15,8	16,3	25. I.	15,8	16,5
15. X.	15,2	15,6	30. XI.	15,7	16,4	29. XII.	14,1	15,9	1. II.	15,3	16,1
19. X.	14,7	15,0	17. XII.	15,9	16,6	1926 2. I.	15,8	16,5	8. II.	15,8	16,9
23. X.	15,1	15,5	30. XII.	14,7	15,9	4. I.	15.9	16,4	1925 11. X.	14.7	15,3

Tabelle II.

Versuchsdaten 1926	Vers.-Temperaturen		Versuchsdaten 1926	Vers.-Temperaturen		Versuchsdaten 1926	Vers.-Temperaturen	
	zu Anfang	am Ende		zu Anfang	am Ende		zu Anfang	am Ende
5. II.	15.9	16,4	3. II.	15,8	17,0	5. IV.	14,8	16,8
24. II.	15.3	16,5	19. II.	15,6	17,0	27. III.	14,8	16,0
17. II.	15,2	16,3	3. III.	14,6	16,5	30. III.	16,0	17,0
26. II.	15,2	16,8	17. III.	15,0	16,0	25. VI.	18,9	19,7
1. III.	14,6	16,5	23. III.	14,8	16,3	29. VI.	19,0	19,9
27. I.	16,2	16,8	2. IV.	16,0	17,0	2. VII.	18,5	19,5

[1]) Diese Zeitschr. **179**, 112, 1926.

Tabelle III.

Versuchsdaten 1925	Vers.-Temperaturen zu Anfang	am Ende	Versuchsdaten 1926	Vers.-Temperaturen zu Anfang	am Ende
31. X.	15,8	16,4	23. VII.	19,6	20,0
13. XI.	16,2	16,7	9. VII.	19,0	19,4
19. XI.	16,1	16,9	13. VII.	19,2	20,0
1926 6. VII.	19,9	20,3	20. VII.	19,6	20,0
16. VII.	19,6	20,4	27. VII.	20,0	20,4

Tabelle IV.

Versuchsdatum	Versuchstemperatur zu Anfang	am Ende
29. XI.	15,7	16,2

Über „Reizwirkungen" an Einzelzellen.

Bemerkungen zu den gleichbetitelten Äußerungen von Hugo Schulz[1]).

Von

Wolfgang Heubner.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 3. März 1927.)

Die Bemerkungen von *Hugo Schulz* können nicht ohne Widerspruch bleiben, denn sie sind geeignet, einen ganz klaren Tatbestand zu verwirren, mindestens für jeden, der nicht sehr genau liest und dabei selbst alle Unstimmigkeiten bemerkt. Aus dem Text der angezogenen Bemerkungen wird es sogar mir, der ich die in Frage stehenden Veröffentlichungen mit am besten kenne, recht schwer, zu beurteilen, ob *Hugo Schulz* die Ausführungen von *Rolf Meier* selbst nicht richtig verstanden hat, oder ob es nur an stehengebliebenen Druckfehlern und an der Art der Ausdrucksweise liegt, wenn man nicht ganz durchschaut, was *Hugo Schulz* meint.

Rolf Meier hat eine Anzahl von Untersuchungen angestellt, deren ausführliche Darstellung im Druck ist, und die der Nachprüfung der Frage dienten, ob es richtig ist, daß kleine Konzentrationen schädigender Gifte an Hefezellen *immer* eine Steigerung der Kohlensäureproduktion bewirken, darüber hinaus aber gleichzeitig das Verhalten des Sauerstoffverbrauchs unter gleichen Bedingungen ermittelten. Zu diesen Untersuchungen wurde die Methode gewählt, die heutigentags als die zuverlässigste angesehen werden durfte; sie stimmte mit der von *Hugo Schulz* vor annähernd 40 Jahren gebrauchten Methode insofern überein, als beide als Maß der Kohlensäurebildung der Hefe die Zunahme des *Druckes* im Reaktionsgefäß benutzten. Über das Ergebnis seiner Untersuchungen veröffentlichte *Rolf Meier* aus bestimmtem Anlaß bereits eine vorläufige Mitteilung[2]); es lautete dahin, daß keineswegs bei allen Substanzen, auch nicht bei allen von *Hugo Schulz* mit positivem Erfolg studierten Substanzen, in niedriger Dosierung eine Steigerung der Kohlensäureproduktion zu finden war, sondern nur bei *einigen*, und dann nur in solchen Konzentrationen, die bereits die Sauerstoffaufnahme und damit den *Gesamtumsatz herabdrückten*. Es wurde also nie eine wirkliche „Steigerung der Lebenstätigkeit" festgestellt.

Hugo Schulz spricht nun von Resultaten, die „auf Grund einer irrig angewandten Methode gezüchtet werden". Hierdurch bitte ich ihn um den Nachweis dessen, was an der von *Rolf Meier* unter meinen Augen

[1]) Diese Zeitschr. **181**, 192, 1927.

[2]) Ebendaselbst **174**, 384, 1926.

angewandten Methode irrig war, und was dabei „gezüchtet“ worden ist. *Hugo Schulz* kann nicht verlangen, daß wir seine eigene Methode möglichst genau befolgen, wenn die Wissenschaft im Laufe der Zeit eingesehen hat, daß manches an dieser Methode verbesserungsbedürftig war, wie z. B. die Benutzung gewöhnlicher (aus sehr verschiedenen Arten gemischter) Hefe, die Ausdehnung der Versuchsdauer über viele Stunden u. dgl.

Da die Ergebnisse von *Hugo Schulz* durch *Rolf Meier* ebensowenig bestätigt werden konnten, wie schon früher durch *Joachimoglu*[1]) und *Zeller*[2]), war der Frage nachzugehen, wie dieser Unterschied zu erklären war. Nun hatte sich mir schon früher bei einer Betrachtung der alten Versuche von *Hugo Schulz* ergeben, daß nur eine recht kritiklose Art der Bewertung ihn dazu geführt hatte, die vielbesprochenen Schlüsse aus seinem Zahlenmaterial zu ziehen, und daß nur eine eigentümliche Art der *Darstellung* dieses Materials daran schuld war, daß es gegenüber anderen auch nur etwas Überzeugungskraft besessen hatte. Es ist charakteristisch für die Gewohnheit des Literaturstudiums auch in vielen Kreisen, die wissenschaftlich ernst genommen zu werden wünschen, daß die Versuche von *Hugo Schulz* so lange und so nachdrücklich als „Beweismaterial“ für eine teils unrichtige, teils wenig sinnreiche Behauptung angeführt werden konnten. Bereits *Zeller* hatte ja[3]) auf mancherlei Mängel in den Versuchen von *Hugo Schulz* und auf die gewaltigen Differenzen in seinen Normalparallelversuchen hingewiesen. Aus diesem Grunde glaubten wir uns mit einer kurzen graphischen Darstellung der Befunde von *Hugo Schulz* begnügen zu dürfen, die jedem einigermaßen erfahrenen Experimentator genug sagen mußte. Die ersten Abbildungen in der Mitteilung von *Rolf Meier* stellen Kurven dar, die nichts anderes sind, als eine Wiedergabe der von *Hugo Schulz* veröffentlichten Zahlen in übersichtlicher Form. Auf *sie* beziehen sich die Worte des Autors, „daß man diesen Kurven nichts hinzuzufügen braucht, um zu erklären, daß sie als Stütze zu so weittragenden Folgerungen keineswegs ausreichen“ — *nicht*, wie *Hugo Schulz* drucken läßt, auf Kurventafeln mit Ergebnissen *seiner* (*Rolf Meiers*) Versuche. Dieser Sachlage trägt *Schulz* in eigentümlicher, nicht ganz verständlicher Weise Rechnung, wenn er jetzt schreibt: „Wenn ich meine Zahlen in derselben Weise graphisch niederlege, wie *Rolf Meier*, kommen ganz ähnliche, um nicht zu sagen dieselben Kurven heraus“. Natürlich *dieselben* (nicht „ganz ähnliche“), denn es sind ja *seine* Zahlen!

Die Kurventafeln aus den Versuchen von *Hugo Schulz* sind so gewonnen, wie nach meiner Ansicht solche Versuche *allein* korrekt wiederzugeben sind: es ist die Druckänderung infolge Produktion an Kohlensäure als Ordinate für jede Viertelstunde der Versuchsdauer als Abszisse eingetragen, jedoch der Fußpunkt für jedes neue Kurvenstück am Ende des vorherigen genommen, so daß die Kurve den *Gesamtablauf* der Kohlensäureproduktion in jedem Versuch wiedergibt. Man sieht nun schon bei den Normalversuchen die unregelmäßigen Differenzen der Steilheit ihres Verlaufs im ganzen wie in einzelnen Abschnitten und erkennt, daß in den Giftversuchen nirgends ein Verlauf zu finden ist, der eine gesetzmäßige Abweichung im Sinne einer größeren Steilheit *außerhalb* der in den Kontrollversuchen vorkommenden Differenzen beweisen könnte.

---

[1]) Diese Zeitschr. 79, 144, 1917; 130, 239, 1922.
[2]) Diese Zeitschr. 171, 45, 1926.
[3]) A. a. O., S. 45 und 46.

Hugo Schulz hatte seinerzeit eine Darstellung gewählt, in der er *einzelne* Stücke der Kurven miteinander verglich, und zwar ohne Rücksicht auf die nach Beginn des Versuchs verstrichene Zeit und ohne Rücksicht auf den Gang des Versuchs während dieser Zeit. Nur auf diese Weise war es ihm möglich, den Schein zu erwecken, als habe er wirklich gefunden, was er gefunden zu haben glaubte. Wenn er jetzt meint, mit der von uns gewählten Methode der Darstellung „käme man nicht weiter", so möchte ich doch mit aller Schärfe bemerken, daß *alles*, was *Hugo Schulz* an abgelesenen Zahlen für die behandelten Versuche beigebracht hat, auf den Kurven verzeichnet ist. Um die Betrachtungen anzustellen, die nach seiner Ansicht „weiterführen", braucht man nur Stückchen jeder Kurve auszuschneiden.

Wir überlassen das Urteil über unsere Darstellungsweise experimenteller Ergebnisse gern den Fachgenossen. Wenn *Hugo Schulz* jetzt im höheren Alter weiter an der Illusion seiner früheren Jahre festzuhalten wünscht, so wird jeder das vollste menschliche Verständnis dafür haben. Aber es geht nicht an, daß unter Berufung auf seine einstigen unvollkommenen und einseitig ausgelegten Versuche weiterhin die Ansichten weiter Kreise tyrannisiert werden.

Vergleichende Untersuchungen über die saure Totenstarre des glykogenhaltigen und die alkalische oder Erschöpfungstotenstarre des glykogenarmen Muskels.

Von

Leonhard Wacker.

(Aus dem pathologischen Institut der Universität München.)

(Eingegangen am 5. März 1927.)

Nach dem Erlöschen des Lebens sind an der Muskulatur der Leiche bekanntlich dreierlei Erscheinungen wahrzunehmen: Zunächst erfolgt mit dem Aufhören der Blutzirkulation eine allgemeine Erschlaffung. Nach einiger Zeit und ganz allmählich werden die Muskeln wieder etwas härter. Der Höhepunkt dieser Erscheinung ist durch einen maximalen Widerstand gekennzeichnet, den die Gelenke einer Lageveränderung der Extremitäten entgegensetzen. Dieser als Totenstarre bezeichnete Zustand kann je nach den Ernährungsverhältnissen der Leiche und der Lufttemperatur tage- ja sogar wochenlang anhalten, um sich dann im dritten Stadium wieder allmählich zu lösen. Wie man jetzt allgemein annimmt, ist die Totenstarre in den Anfangsstadien als eine der physiologischen Kontraktion ähnliche Dauerverkürzung der Muskeln aufzufassen. Diese äußere Ähnlichkeit der Starre mit der Kontraktion geht parallel mit analogen chemischen Prozessen, die sich nach dem Tode innerhalb der Muskeln abspielen und die die Erscheinungen einleiten. Während aber der Muskel des lebenden Organismus dem Willen des Individuums blitzartig gehorcht und die durch die Nerven vermittelte Kontraktion den Bedürfnissen entsprechend sofort wieder rückgängig gemacht werden kann, ist der Eintritt der Starrekontraktur ein langsamer und träger und der Vorgang durch die Irreversibilität charakterisiert.

Die zur Einleitung einer Muskelaktion bzw. einer Starrekontraktur erforderlichen und im Muskel zu produzierenden Milchsäuremengen sind ihrer Größenordnung nach sehr verschieden. Dem Bedarf von Bruchteilen eines Milligramms[1]) Milchsäure (0,7 mg-Proz.) zur Aus-

[1]) Der 1 g schwere Gastrocnemius des Frosches bedarf bei maximaler Einzelzuckung etwa 0,007 mg Milchsäure (siehe *Meyerhof*, Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. 8, 1, 533).

Milchsäurezunahme in 24 Stunden pro 100 g weißer Kaninchenmuskel
im Hunger (Mittel) . . . . 31,3 mg-Proz.
„ Urethanschlaf entblutet . 565,1 „

lösung einer maximalen Einzelzuckung beim Frosch stehen bei der Totenstarre des Kaninchens die 45- bis 800fachen Mengen (in 24 Stunden) gegenüber, die anfangs rasch, später, nach dem Eintritt der Starre, langsam sich im Muskel ansammeln[1]). Die Entwicklungszeit der Starre steht im geraden Verhältnis zur produzierten Milchsäuremenge. Während bei der physiologischen Kontraktion die geringsten Mengen die blitzartige Zusammenziehung verursachen, bewirken nach dem Tode etwa die 20- bis 45fachen Mengen eine in wenigen Minuten eintretende Starrekontraktur, und die größte Säureproduktion mit der 600- bis 800fachen Menge der für die Zuckung beim Frosch erforderlichen Menge ist erst nach 3 Stunden in der Lage, die Muskulatur des Kaninchens in den Starrezustand zu versetzen. Nur in Ausnahmefällen — bei der kataleptischen Totenstarre — soll, unter bis jetzt unbekannten Bedingungen, eine physiologische Kontraktion direkt in eine Starrekontraktur der Leiche übergehen, so daß das erwähnte Erschlaffungsstadium ganz fortfällt. Die Existenz einer kataleptischen Starre ist meines Erachtens nicht mit Sicherheit erwiesen, denn die Berichterstattung, die vielfach auf lange vergangene Kriege zurückgeht, ist nicht immer einwandfrei und genügt nicht der Anforderung, daß die im Augenblick des Todes innegehabte Stellung über den Tod hinaus beibehalten sein muß, auch wenn sie durch die Schwerkraft hätte verändert werden müssen[2]).

Die Eintrittszeit der Totenstarre kann bekanntlich durch angestrengte Muskeltätigkeit kurz vor dem Tode erheblich abgekürzt werden. Man hat dies auf die Ansammlung von Milchsäure im ermüdeten Muskel zurückgeführt. Diese Erklärung läßt sich jedoch nicht mit unseren Beobachtungen in Einklang bringen, denn beim Hunger wie überhaupt beim Erschöpfungstod tritt die Starre besonders rasch ein, während gerade hier die auftretenden Milchsäuremengen gering sind. Die Beobachtung, daß die Starre bei verhungerten Kaninchen rasch eintritt, ist übrigens nicht neu. Schon *Kühne*[3]) bemerkte bei Kaninchen, die *Cl. Bernard* in Nancy zwecks anderweitiger Studien verhungern ließ, eine — wie er sich ausdrückte — mit dem letzten Atemzuge einsetzende Starre. Er untersuchte daraufhin den Muskel auf sein Verhalten gegen Reagenzpapier und konstatierte im Gegensatz zu dem Befund von *du Bois Reymond* bei der gewöhnlichen sauren Starre, in diesem Falle eine alkalische Reaktion. Diese interessanten und für die Erklärung verschiedener Vorgänge wichtigen Beobachtungen

---

[1]) Vgl. die Milchsäurebildungskurven diese Zeitschr. 75, 111/112, 1916.

[2]) Vgl. *J. Baumann*, Zeitschr. f. gerichtl. Med. 2, 647, 1923; *W. Gerlach*, Ergebn. d. Pathol. 20, 2, 273.

[3]) *Kühne*, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1859; Myologische Untersuchungen, S. 144. Leipzig 1860.

Kühnes sind nicht in die Handbücher übergegangen und in Vergessenheit geraten, denn alle späteren Autoren und Referenten berichten nur von dem trüben, undurchsichtigen und sauer reagierenden, starren Muskel, trotzdem bei Leichen nach langandauernden, mit großem Gewichtsverlust einhergehenden Erkrankungen eine alkalische Reaktion des Muskels nicht allzu selten ist[1]). *Man muß demnach zwischen einer sauren und alkalischen Totenstarre unterscheiden.*

Wenn hier in der Folge von einer alkalischen und einer sauren Reaktion des Muskels gesprochen wird, so ist dies aber doch cum grano salis zu nehmen, denn der Muskel ist bekanntlich sauer und alkalisch zu gleicher Zeit und büßt diese amphotere Reaktion — soweit dies bisher bekannt ist — auch nie vollkommen ein. Besonders im physikalisch-chemischen Sinne kann man kaum von saurer und alkalischer Reaktion sprechen, weil im Muskel, selbst bei reichlicher Milchsäurebildung, infolge der ausreichenden Pufferung nur eine geringe Verschiebung vom Neutralpunkt erfolgt. Dagegen besitzt aber der Muskel, bei den zwei verschiedenen Starreformen und vor dem Eintritt derselben, eine größere oder geringere Aufnahmefähigkeit für Milchsäure, ohne seinen amphoteren Charakter einzubüßen. Diese Verhältnisse lassen sich zahlenmäßig durch den sogenannten Säurealkaliindex[2]) zum Ausdruck bringen. Bestimmt man im Kochextrakt des Muskels titrimetrisch — unter Zuhilfenahme von geeigneten Indikatoren — die Alkaleszenz und die Acidität in Kubikzentimetern n/10 Säure bzw. n/10 Alkali, bezogen auf 100 g Muskel, so liefert der

$$\text{Quotient} = \frac{\text{Kubikzentimeter Acidität}}{\text{Kubikzentimeter Alkaleszenz}}$$

den Säurealkaliindex. Er stellt also das Verhältnis der sauren zu den alkalischen Bestandteilen dar.

Bei der alkalischen Totenstarre besitzt der Muskel einen Säurealkaliindex, der kleiner ist als 1, d. h. die alkalischen Bestandteile überwiegen die sauren, er verhält sich also in dieser Hinsicht genau wie ein ruhender Muskel. Bei der sauren Totenstarre jedoch steigt der Index je nach der Todesart, Tierart (ob roter oder weißer Muskel) und dem Ernährungszustand bis auf 4, 6 und höher, d. h. also die sauren Bestandteile können die alkalischen um das Vier- oder Sechsfache überwiegen. Mit der Größe des Index geht der Milchsäuregehalt parallel oder vielmehr der Index ist von der Menge der gebildeten Milchsäure abhängig. Ob der ruhende Warmblütermuskel gar keine Milchsäure enthält, ist noch nicht mit Sicherheit entschieden.

Mit der Erkenntnis, daß das Glykogen die Muttersubstanz der im Muskel bei diesen Prozessen produzierten Milchsäure und die Menge der letzteren wiederum ausschlaggebend ist für eine alkalische oder saure Totenstarre, ist es einleuchtend, warum beim Mangel an Glykogen, wie dies beim Erschöpfungstod der Fall ist, der Muskel überhaupt nicht sauer werden kann. Bei vollkommenem Glykogenmangel sollte man ein völliges Ausbleiben der Starre erwarten, weil nach unserer jetzigen

---

[1]) *Oppenheim* und *Wacker*, Berl. klin. Wochenschr. 1919, Nr. 42, S. 990.

[2]) *L. Wacker*, diese Zeitschr. 75, 119, 1916. *Baur, Kuhn* und *Wacker*, Münch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 6, S. 169.

Anschauung ohne Glykogen bzw. Kohlehydrat keine Milchsäure entstehen kann.

Im Tierexperiment konnte jedoch nie weder ein Ausbleiben der Milchsäurebildung noch der Starre beobachtet werden. Die Starre ist im Gegenteil beim Hunger- oder Insulintod oft recht kräftig, während sie gemäß den Messungen gemeinschaftlich mit *Oppenheim* (a. a. O.) bei kachektischen menschlichen Leichen meistens sehr gering ist. Der Grund ist vielleicht (neben dem Zeitpunkt der Messung) in der gut erhaltenen Struktur des Muskels bei den Hunger- und Insulinleichen zu suchen, während bei lang anhaltenden Krankheiten die Muskelsubstanz in größerem Umfang eingeschmolzen wird und oft eine ödematöse, sulzige, strukturlose Beschaffenheit hat.

Aus dem Vorgesagten geht hervor, daß man die alkalische Totenstarre experimentell erzeugen kann, wenn man den Muskel vor dem Tode möglichst glykogenarm macht, d. h. einen Erschöpfungszustand schafft. Aus diesem Grunde wird man *die alkalische Starre auch als Erschöpfungstotenstarre bezeichnen können.*

Es liegt in der Natur der Verhältnisse, daß man sich dazu nur rücksichtsloser Methoden bedienen kann, wie exzessive Arbeit, Hunger, Kälte, Krampfgifte, Insulin usw.

In der vorliegenden Arbeit habe ich mir zum Ziele gesetzt, den Zustand der Erschöpfungstotenstarre in chemischer Hinsicht dem der sauren Starre vergleichend gegenüberzustellen.

I. Die saure Totenstarre des glykogenhaltigen Muskels.

Die saure Totenstarre ist die bei menschlichen Leichen und bei Schlachttieren am häufigsten zu beobachtende Form. Die umfangreiche Literatur bezieht sich daher fast ausschließlich auf diese. Wenn ich trotzdem noch einige Untersuchungsresultate, die im wesentlichen aus früheren Untersuchungen bekannt sind, hinzufüge, so geschieht es, um direkte Vergleichswerte zur alkalischen Starre zu erhalten.

Die saure Starre setzt guten Ernährungszustand bzw. ausreichenden Glykogengehalt im Muskel voraus. Beim natürlichen, nicht gewaltsamen Tode der Menschen und der Tiere wird dies nicht immer zutreffen, deshalb finden wir alle Übergänge von der stark sauren zur alkalischen Starre. Die Muskeln eines Selbstmörders, Verunglückten oder Apoplektikers werden eine größere Milchsäuremenge produzieren als jene einer Person, die nach langem Siechtum gestorben ist.

Um die im Muskel sich vollziehenden Prozesse unter verschiedenen Bedingungen zu vergleichen, mußte auf Tierversuche zurückgegriffen werden. Ohne Rücksicht auf die das Resultat beeinflussenden Abwehrbewegungen der Versuchskaninchen wurden diese durch Nackenschlag, Entblutung und durch Erstickung, mit CO_2-Gas oder durch Luftembolie, getötet. Zur Untersuchung gelangten die Muskeln der Hinterläufe, und zwar wurde der eine Lauf möglichst rasch nach dem Tode, der andere erst nach

Tab

Nr.	Datum	Rasse der Kaninchen	Gewicht g	Art des Todes	Zeit der Untersuchung nach dem Tode	We Acidität	Alkaleszenz	Pufferungs-
5	1. XII. 1925	Schwarzloh	1650	Nackenschlag	Sofort	57,33	30,66	87
					24 Std.	66,66	9,33	75
6	10. V. 1926	Graues Kaninchen	4220	„	Sofort	52,00	37,33	89
					24 Std.	80,00	8,00	88
17	20. V. 1926	Grauschwarzes Kaninchen	3900	Erstickg. durch Luftembolie	Sofort	50,66	45,33	95
					24 Std.	74,66	12,93	87
27	22. X. 1926	Schwarzloh	2470	Erstickung in CO_2-Gas	Sofort	57,33	50,66	107
					24 Std.	86,66	14,66	101
22	11. VIII. 1926	„	1700	Entblutung aus Carotis	Sofort	62,66	36,00	98
					24 Std.	80,00	13,33	93
24	5. X. 1926	Graues Kaninchen	2900	Dasselbe	24 Std.	77,30	16,00	93
23	11. VIII. 1926	Schwarzes Kaninchen	1740	Entblutung nach 5 Tagen Hunger	Sofort	57,33	48,00	105
					24 Std.	78,66	17,33	95.
				Mittelzahlen	Sofort	56,21	41,33	97.
					24 Std.	77,70	13,08	90.
12	3. II. bis 14. III. 1926	Scheckiges Kaninchen	2250 1120	*)	24 Std.	67,00	43,00	110.

24 Stunden in Angriff genommen. Weiße und rote Muskeln wurden getrennt untersucht. Als Vergleichsmaterial dienten die Kochextrakte (siehe unter Methodik). Die Untersuchung erstreckte sich auf die Feststellung des Milchsäuregehalts, des Verhältnisses der alkalischen zu den sauren Bestandteilen (Index), der H-Ionenkonzentration, die Menge der im Extrakt befindlichen Albuminateiweißkomponente und auf die Ermittlung der Eintrittszeit der Starre nach dem Tode. Auf die interessanten Veränderungen in den Aschenbestandteilen und die experimentelle Beeinflussung der Zeit des Starreeintritts werde ich in späteren Abhandlungen zurückkommen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Tabelle I wiedergegeben. Sie zeigt in erster Linie das Ansteigen des Milchsäuregehalts innerhalb 24 Stunden nach dem Tode und die Folgeerscheinungen dieser Säurezunahme auf die Puffersubstanzen. Durch den Neutralisationsprozeß geht die titrierbare Alkaleszenz im Extrakt wesentlich zurück und die Acidität steigt an, dementsprechend nimmt der Index zu. Mit zunehmender Säure werden die Alkalialbuminate mehr oder weniger vollkommen im Muskel zerlegt und nehmen daher im Extrakt (nach 24stündigem Lagern des Muskels) bis auf geringe Reste ab. Beim weißen Muskel fällt der Eiweißgehalt im Extrakt von 0,8130 Proz. (im Mittel) des frischen Muskels bis auf 0,0064 Proz. nach 24 Stunden, beim roten ist es ähnlich, doch ist die Fällung nicht so vollständig. Durch die Fällung erklärt sich das trübe opake Aussehen. Die Zeit des Starreeintritts variiert beim Kaninchen zwischen ½ bis 2 oder 3½ Stunden, eine Gesetzmäßigkeit in der Eintrittszeit ist bei dieser Versuchsanordnung nicht zu erkennen.

…uskel			Roter Muskel						Zeit des Starreeintritts nach dem Tode	Bemerkungen
Index	Extrahierbares Eiweiß	Milchsäuregehalt	Acidität	Alkaleszenz	Pufferungsbreite	Index	Extrahierbares Eiweiß	Milchsäuregehalt	Stdn.	
1.8[illegible]	0,6945	0,6452	54,66	28,66	83,32	1,90	0,6066	0,3937	2	
7.14	0,0386	0,6965	66,66	9,33	75,99	7,14	0,0373	0,6262		
1.39	0,7493	0,3767	44,00	36,00	80,00	1,22	0,7040	0,2546	2	
[illegible]	0,0000	0,7348	57,33	13,33	70,66	4,30	0,0947	0,5485		
1.11	1,0453	0,2794	41,33	40,00	81,33	1,03	1,0066	0,2199	1¾	
5.77	0,0000	0,7504	62,66	14,66	77,32	4,27	0,0626	0,5641		
1.13	—	0,3519	43,33	46,66	89,99	0,93	—	0,1945	1¼	
5.9[illegible]	—	0,7555	66,66	24,00	90,66	2,77	—	0,4181		
1.74	0,4053	0,4222	48,66	36,66	85,32	1,32	0,8346	0,2628	1½	
6.0[illegible]	0,0000	0,6520	68,66	18,66	87,32	3,67	0,0387	0,6189		
4.83	0,0000	0,6479	62,66	24,00	86,66	2,61	0,4170	0,4119	1½	p_H weiß Chinhydronelektrode zwischen 5,99 u. 6,11. p_H rot Chinhydronelektrode zwisch. 6,21 und 6,43
1.39	1,1706	0,2856	44,66	45,33	89,99	0,98	0,8746	0,2235	1½	
4.53	0,0000	0,6996	62,66	19,33	81,99	3,24	0,2053	0,5485		
1.40	0,8130	0,3935	46,10	38,88	84,98	1,23	0,8053	0,2581		
6.31	0,0064	0,7052	63,89	17,61	81,50	4,00	0,1426	0,5337		
1.55	0,5900	0,2322	61,00	33,00	94,00	1,84	0,3450	0,2291		*) Gestorben an einer Darmstörung. Die Sektion ergab ein Fettdepot im Nacken

Roter und weißer Muskel.

Bekanntlich besteht die Skelettmuskulatur des Kaninchens aus zwei durch das Aussehen leicht erkennbaren Spielarten. Der weiße Muskel vermag rascher und mehr Milchsäure zu bilden (Tabelle I) als der rote. Daher wird der weiße auch der flinkere genannt, gegenüber dem ausdauernden, kernreichen roten. Die Übergangsstufen, d. h. die blassen Muskel wurden tunlichst von der Untersuchung ausgeschaltet und nur weiße oder rote ausgewählt. Aus den Mittelzahlen der Tabelle ist ersichtlich, daß der weiße Muskel innerhalb 24 Stunden nach dem Tode 0,7052 Proz. Milchsäure zu produzieren vermag, während der rote nur 0,5337 Proz. enthielt. Dementsprechend war der Index beim weißen 6,31 gegenüber 4,00 beim roten. Der Gehalt des frischen Muskels mit 0,3935 beim weißen und 0,2581 Proz. beim roten ist verglichen mit den Verhältnissen beim ruhenden glykogenarmen Muskel sicherlich zu hoch, weil vom Moment des Todes bis zur Zerstörung der Fermente durch das kochende Wasser etwa 10 Minuten verstreichen (Näheres siehe unter Methodik). Auch in der H'-Konzentration des Extrakts (24 Stunden nach dem Tode) läßt sich ein Unterschied, wenn auch ein geringer, zwischen rotem und weißem Muskel wahrnehmen. Beim weißen schwankte p_H — an der Chinhydronelektrode gemessen — zwischen 5,99 bis 6,11, war somit, gegenüber 6,23 bis 6,43 beim roten, etwas saurer als der letztere. Die wahren Werte der innerhalb des Muskels herrschenden H'-Konzentration stellen diese Zahlen nicht dar, weil beim Kochen Umsetzungen und CO_2-Verluste stattfinden können, aber sie entfernen sich nicht allzuweit von der Wirklichkeit, denn nach intensiver Tätigkeit

wurden im lebenden Muskel H′-Konzentrationen von $p_H = 6{,}6$ bis 6,7[1]) gemessen.

Unsere Messungen der H′-Konzentrationen im Extrakt deuten zwar bestehende Unterschiede an, aber die Differenzen kommen doch viel deutlicher in den oben angeführten Milchsäurewerten und Indexzahlen zum Vorschein.

Der Gehalt an Eiweiß im Extrakt ist bei beiden Spielarten direkt nach dem Tode mit 0,8130 Proz. weiß und 0,8053 Proz. rot ungefähr gleich, er geht beim weißen auf nahezu Null (0,0064 Proz.) beim roten auf 0,1426 Proz. zurück, ganz entsprechend dem angeführten Milchsäurebildungsvermögen.

Die Summe von Alkaleszenz + Acidität, ausgedrückt in Kubikzentimetern n/10 Säure + n/10 Alkali pro 100 g Muskel habe ich gemeinsam mit *Fahrig* als *Pufferungsbreite*[2]) bezeichnet. Hierdurch soll ausgedrückt sein, innerhalb welcher Grenzen die Menge der alkalischen und sauren Bestandteile eines Gewebes schwanken kann, ohne daß sein amphoterer Charakter verloren geht. Man sollte deshalb erwarten, daß diese beim frischen Muskel die gleiche ist wie beim totenstarren (siehe Tabelle I). Tatsächlich bestehen aber Unterschiede, wie z. B. weißer Muskel, frisch, 97,54 ccm gegenüber 90,78 ccm nach 24 Stunden und rot 84,98 ccm, frisch, zu 81,50 ccm nach 24 Stunden. Diese Differenz kann man auf zweierlei Ursachen zurückführen: Der Extrakt des frischen Muskels enthält mehr Eiweißkörper als der nach 24 Stunden. Bekanntlich vermögen die Eiweißsubstanzen etwas Säure sowohl wie Alkali zu binden, was bei der Titration zur Auswirkung kommt, und dann fehlt im Extrakt des totenstarren Muskels das Säureäquivalent der im Muskel ausgefallenen sauren Eiweißkomponente.

Wenn wir uns weiter die Frage vorlegen, weshalb der weiße Muskel befähigt ist, mehr und rascher Milchsäure zu bilden als der rote, so gibt uns hierüber auch die Tabelle I Aufschluß: Die Größe der Milchsäureproduktion eines Gewebes ist weitgehend abhängig von der Größe der Pufferung (Pufferungsbreite a. a. O.). Diese beträgt beim weißen Muskel 24 Stunden p. m. 90,78 ccm, beim roten 81,50 ccm. Sie ist demnach beim weißen erheblich größer. Der Grund, warum eine bessere Pufferung eine größere Milchsäureproduktion zuläßt, ist leicht verständlich. Nach *Warburg*[3]) wird die Tätigkeit der milchsäurebildenden Fermente bei einer H′-Konzentration von $p_H = 6{,}0$ gehemmt, d. h. wenn die sauren Bestandteile gegenüber den alkalischen zugenommen haben, tritt bei einem bestimmten Zeitpunkt, der sich besser durch den Index ausdrücken ließe, die Hemmung ein. Wenn nun im weißen Muskel von vornherein eine größere Alkaleszenz vorhanden ist, so kann sich natürlich auch mehr Milchsäure bilden, bevor die Hemmung eintritt.

II. Die alkalische oder Erschöpfungs-Totenstarre des glykogenarmen Muskels.

Wenn die Glykogenvorräte des Muskels nahezu vollkommen erschöpft sind, so muß die Herz- und Atmungstätigkeit aus Mangel an Energiematerial aussetzen, es tritt der Erschöpfungstod ein. Infolge

---

[1]) *H. Schade, P. Neukirch* und *H. Halpert*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **24**, 11, 1921.

[2]) *C. Fahrig*, Über den Kohlehydratumsatz der Geschwülste und ihrer normalen Vergleichsgewebe usw. Habilitationsschrift München 1927.

[3]) *O. Warburg* und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **152**, 309, 1924.

des Kohlehydratmangels wird sich auch nur eine geringe Milchsäuremenge bilden können. Trotzdem sind diese spärlichen Mengen (Zuwachs beim Hungermuskel 24 Stunden p. m. etwa 0,03 Proz., bei einem Gesamtmilchsäuregehalt von 0,04 Proz.) (s. Tabelle II) hinreichend, um eine kräftige Starre einzuleiten, die allerdings von kürzerer Dauer ist als die saure. Sie beginnt sich bei Zimmertemperatur nach etwa 24 Stunden langsam zu lösen.

Hieraus ist ersichtlich, daß es im Tierexperiment gelingen muß, immer dann eine alkalische Starre zu erzeugen, wenn man das Tier erschöpft, d. h. glykogenarm macht. Die Ursache, warum der Muskel in diesem Falle nach dem Tode alkalisch bleibt, ist leicht ersichtlich: Gleich dem ruhenden glykogenhaltigen Muskel ist auch der ruhende (frische) glykogenarme Muskel alkalisch (Index 0,47). Wenn aus Glykogenmangel nur wenig Milchsäure entstehen kann, wird die alkalische Reaktion zwar etwas nach der sauren Seite verschoben werden, aber im wesentlichen wird der Muskel doch alkalisch (Index 0,56) bleiben. Auf ein Überwiegen der oxybiotischen Vorgänge, wie wir dies früher beim Insulin[1]) annahmen, wird man die alkalische Reaktion beim Erschöpfungstod im allgemeinen nicht zurückführen können. Um die Glykogenvorräte zu erschöpfen, sind zwei Wege denkbar:

1. Exzessive Beanspruchung durch Arbeit, Wärmeentzug, Fieber, Krampfgifte und Bakterientoxine.
2. Ungenügende Kohlehydratzufuhr bei Hunger und Insulin und langwierigen Krankheiten.

Die Entglykogenisierung des Muskels durch forcierte Arbeit ist bei gut genährten Tieren schwer erreichbar, denn die Umwandlung des Depotfettes (und Eiweißes) in Kohlehydrat erfolgt sehr rasch, und schließlich setzen Ermüdungsstoffe der Muskeltätigkeit ein Ende, ohne daß die Glykogenvorräte vollkommen erschöpft zu sein brauchen, da ja immer noch Depotfett genügend zur Verfügung steht. Viel wirkungsvoller sind in dieser Hinsicht Krampfgifte wie Strychnin. Selbstredend gelingt es durch Hunger[2]) immer, die Glykogendepots zu leeren, doch müssen vorher die Fettdepots restlos aufgebraucht sein. Viel rascher als Hunger wirken aber subkutane Insulininjektionen[3]), besonders wenn die Kaninchen vorher 4 bis 5 Tage gehungert haben. Infektionskrankheiten können die Entglykogenisierung auf dreierlei Weise einleiten: Einmal können Toxine, wie bei Tetanus und Cholera, zu heftigen Krämpfen Anlaß geben, dann kann erhöhte Körpertemperatur einen vermehrten Kohlehydratverbrauch bedingen, und schließlich kann die Nahrungsaufnahme eingeschränkt bzw. die Verdauung gestört sein.

[1]) *Baur, Kuhn, Wacker*, a. a. O.

[2]) *Aldehoff*, Zeitschr. f Biol. 25, 137, 1889; *Külz*, Festschrift auf *Ludwig*. Marburg 1890.

[3]) *Staub*, „Insulin“, S. 58 (Verlag Springer, 1925). Dort weitere Literatur. *H. Edelmann*, Zieglers Beitr. 75, 589, 1926.



Ta

Nr.	Datum	Art und Rasse des Versuchstieres	Todesart	Anfangsgewicht g	Endgewicht g	Gewichtsabnahme Proz.	Zeit der Untersuchung nach dem Tode	W Acidität	
—	3. XI. 1926	Hund ♂, rauhh. Fox	Entblutung nach Ermüdung	10100	—	—	Hinterbein sofort 24 Std. Vorderbein 17 Std.		
26	16. X. 1926	Kaninchen, Schwarzloh	Vergift. d. kl. Strychnindosen	2480	—	—	sofort 24 Std.	42,00 48,00	5 4
37	14. XII. 1926 16. XII. 1926	Albinokaninchen	ebenso	2260	 1860	 17,8	sofort 24 Std.	35,33 45,33	5 5
8	17. XII. 1925	Schwarzes Kaninchen	Insulin, dann Nackenschlag	2560	 —		sofort 24 Std.	39,71 47,94	6 5
36	14. XII. 1926	Graues Kaninchen	4 Tage Hunger, dann Insulin	3300	2980	9,9	ca. 26 Std.	32,66	5
13	3. II. 1926 16. III. 1926	Gelbes Kaninchen	Hunger	2060	 800	 61,1	sofort 24 Std.	35,66 39,74	6 61
10	24. XI. bis 9. XII. 1925	Kaninchen, Schwarzloh	„	1870	 1130	 49,5	sofort 24 Std.	28,00 30,66	6 5
11	31. XII. 1925 bis 26. I. 1926	Kaninchen, Schwarzloh	„	1890	 910	 51,8	sofort 24 Std.	31,40 33,54	6 67
18	10. VI. bis 10. VII. 1926	Graues Kaninchen	„	3440	1850	46,2	44 Std.	30,67	53
19	10. VI. bis 27. VII. 1926	Schwarzes Kaninchen	„	3550	1520	57,2	ca. 12 Std.	35,33	62
							Mittelzahlen aus Hungerkanin[chen]		
							sofort 12–24 Std.	31,69 33,98	67 60

*) 0,21 Proz. Glykogen. — **) 19,9 mg-Proz. Milchsäure im Blut. — †) 0,01 Proz. Glykogen. — ††)

Die charakteristische Erscheinung des Erschöpfungstodes — in jeder Form — ist der rasche Starreeintritt. Auch wenn der Tod unter Krämpfen erfolgt, ist nach dem Aufhören der Blutzirkulation eine Erschlaffung der Muskulatur die Regel. Wäre es möglich, dieses, wenn auch kurze Erschlaffungsintervall ganz auszuschalten, so wäre die kataleptische Totenstarre der Erschöpfungstotenstarre zuzurechnen.

Einstweilen halte ich dies überhaupt für „theoretisch“ unmöglich, weil Kontraktion und Erschlaffung unter Einfluß des Nervensystems stehen.

…I.

…uskel				Roter Muskel							
Pufferungsbreite	Index	Extrahierb. Eiweiß Proz.	Milchsäure Proz.	Acidität	Alkaleszenz	Pufferungsbreite	Index	Extrahierb. Eiweiß Proz.	Milchsäure Proz.	Zeit des Starreeintritts nach dem Tode	H-Ionenkonzentration des Extrakts und Verschiedenes
				30,00	50,67	80,67	0,59	2,2613	0,0962		*)
				72,00	24,00	96,00	3,00	0,1306	0,5278	n. 1/2 h	**)
				47,33	32,67	80,00	1,44	1,2680	0,2214	22′	
9[illegible].33	0.76	1,5627	0,1479	40,67	50,00	90,67	0,81	1,4455	0,1169		†)
9[illegible].33	0,97	1,4360	0,1573	51,33	45,33	96,66	1,13	1,3627	0,1674	5′	
9[illegible].33	0,63	1,8533	0,0227	34,00	49,33	83,33	0,69	1,6493	0,0186		
9[illegible].33	0,90	1,5826	0,0921	39,33	44,00	83,33	0,89	1,5013	0,0719	3′	
100,70	0,65	1,4099	0,0823	36,98	50,00	86,98	0,74	1,2726	0,1857		
105,47	0,83	1,3575	0,1029	49,31	50,00	99,31	0,98	1,0027	0,1967	21′	
91,32	0,55	1,7866	0,0382	40,00	48,00	88,00	0,83	1,6920	0,0765	unbek.	††)
100,[illegible]2	0,55	1,2940	0,0136	37,46	61,62	99,08	0,60	1,3005	0,0229		
101,[illegible]	0,64	1,2794	0,0374	39,74	56,77	96,51	0,70	1,2016	0,0452	15′	
9[illegible]	0,41	1,6666	0,0131	29,33	65,33	94,66	0,44	1,7786	0,0131		
[illegible],52	0,52	1,1826	0,0203	30,66	58,66	89,32	0,52	1,1093	0,0387	12′	
100,82	0,45	1,6479	0,0100	30,35	66,96	97,31	0,45	1,7284	0,0114		
1[illegible],63	0,49	1,6246	0,0282	35,14	62,17	97,31	0,56	1,7188	0,0279	2′	
8[illegible]	0,57	1,2040	0,0533	31,33	46,00	77,33	0,68	1,2386	0,0450	10′	Weiß: p_H = 7,14 Calomelelektr., 7,10 Chinhydronelektr. Rot: 7,04
9[illegible].33	0,57	0,9933	0,0786	32,00	58,00	90,00	0,55	0,9393	0,0745	unbek.	Weiß: p_H = 7,145 Chinhydronelektr. Rot: 7,06 desgl.
Nr. 13. 10, 11, 18, 19.											
9[illegible],11	0,47	1,5361	0,0122	32,38	64,63	97,01	0,49	1,6025	0,0158		
9[illegible],52	0,56	1,2567	0,0435	33,77	56,33	90,10	0,60	1,2415	0,0462		

…Tagen Hunger 10 I.-E. Starb in der Nacht.

Entsprechend den geringen Milchsäurewerten[1]) (weiß sofort 0,0122 Proz., nach 24 Stunden p. m. 0,0435 Proz.; rot sofort 0,0158 Proz. und 0,0462 Proz. 24 Stunden p. m.) ist der Index beim weißen Muskel gleich nach dem Tode 0,47 und nach 24 Stunden 0,56, beim roten 0,47 und 0,49. Der große Unterschied in der Milchsäureproduktion des weißen und roten Muskels ist demgemäß bei der alkalischen Starre verschwunden, was ja durch das Erschöpfen der Glykogenvorräte in beiden Muskelarten leicht verständlich ist.

1) Diese Zahlen beziehen sich auf Mittelwerte des Hungermuskels. Sie stellen die niedrigsten Ergebnisse dar, weil im Hungertod die Entglykogenisierung am vollkommensten ist.

Die H′-Konzentration des Extrakts — gemessen an der Chinhydronelektrode — ist beim weißen Muskel mit $p_H = 7{,}10$, beim roten mit 7,06 bestimmt worden. Eine Annäherung an den ruhenden Muskel zeigt sich bei der alkalischen Starre in dem hohen Gehalt des Extrakts an Alkalialbuminaten. Er ist höher als beim glykogenhaltigen Muskel (über die Gründe siehe unter Methodik). Die Menge der bei der Neutralisation mit Salzsäure fällbaren Eiweißkomponente beträgt für den frischen weißen Hungermuskel 1,53 Proz. und nach 24 Stunden 1,25 Proz., beim roten 1,60 bzw. 1,24 Proz. Bei einem Trockengehalt von 24 Proz. des Kaninchenmuskels ergibt sich hieraus, daß der frische Hungermuskel des Kaninchens 6,3 bis 6,6 Proz. Eiweiß an Alkali gebunden erhält und nach Eintritt der Starre (24 Stunden p. m.) nur etwa 5,2 Proz.

Es macht sich demnach auch im erschöpften Muskel eine Verminderung des Eiweißgehaltes im Extrakt bemerkbar, wenn er auch viel geringer ist, als bei der sauren Starre. Ein prinzipieller Unterschied zwischen saurer und alkalischer Starre existiert somit auch hierin nicht.

Die bessere Pufferung des weißen Muskels gegenüber dem roten läßt sich auch beim erschöpften Muskel verfolgen. (Tabelle II, Versuch 10, 11 und 13.)

Experimentell kann man die alkalische Starre durch Erschöpfung in der oben angegebenen Weise erzeugen:

I. Entglykogenisierung des Muskels durch raschen Glykogenverbrauch.

a) Durch exzessive Arbeitsleistung.

Als Versuchstier diente ein 9 Monate alter männlicher, rauhhaariger Fox im Gewicht von 10,1 kg. Er wurde zuerst einige Tage bei normaler Fütterung auf seinen Gesundheitszustand geprüft und an das Laufen in einer Lauftrommel gewöhnt. Die Holztrommel besaß einen Umfang von 5 m, war seitlich teilweise durch Glas und teilweise behufs Ventilation durch Drahtnetze geschlossen und mit einer Tür versehen. Der Antrieb geschah durch einen Lederriemen über ein Vorgelege durch einen Motor. Die Umdrehungszahl war so reguliert, daß die Trommel in der Minute 18 Umdrehungen, der Hund also pro Stunde etwa 5,4 km laufen mußte. Um ein Wundlaufen der Füße auf dem Holzboden der Trommel zu verhindern, wurden sie mit Lappen umwickelt. Am Vortage erhielt das Tier nur eine geringe Menge Fleisch und mußte 4 Stunden laufen. Am Versuchstage selbst wurde er um 4 Uhr 20 Minuten früh in die Trommel gebracht und lief ununterbrochen bis 5 Uhr 20 Minuten nachmittags, also 13 Stunden = 70 km mit zwei kurzen Pausen zur Verabreichung von Trinkwasser. Hierauf wurde er herausgenommen und möglichst rasch durch Durchschneidung der beiden Carotiden mit einem Sektionsmesser entblutet. Beim Herausnehmen zeigte sich der Hund zwar sehr müde, aber eine vollkommene Erschöpfung war keineswegs zu bemerken.

Die Totenstarre trat an den Vorderbeinen schon nach 22 Minuten, an den hinteren Extremitäten erst nach 30 Minuten ein; diesem Befunde entsprechen auch die chemischen Untersuchungen der Muskeln. Bei den Vorderbeinen war der Index 1,44 mit einer Milchsäurebildung von 0,2214 Proz. verhältnismäßig gering und der Erschöpfung näher als bei den Muskeln der Hinterbeine, die bei einem Index von 3,00 noch 0,5278 Proz. Milchsäure zu bilden vermochten, also noch vollkommen sauer waren. Der Glykogengehalt der hinteren Muskel sofort nach dem Tode war mit 0,21 Proz. noch

sehr hoch. Der Milchsäuregehalt des Blutes betrug 19,9 mg-Proz. Aus dem Verhalten der Muskeln der Vorderbeine ist ersichtlich, daß auf diese Weise eine alkalische Starre erreicht werden könnte, wenn man das Tier vor dem Versuch einige Tage hungern lassen und die Laufperiode verlängern würde. Ich habe einstweilen aus Humanitätsgründen auf weitere diesbezügliche Versuche verzichtet, weil ich glaube, eine hinreichende Beweisführung durch die folgenden Strychninversuche gebracht zu haben.

b) Entglykogenisierung des Kaninchenmuskels durch kleine Strychninmengen.

Zur Entglykogenisierung wurden die Methoden von *Külz*[1]) bzw. *Frentzel*[2]) und *Simon*[3]) eingeschlagen.

In zwei Versuchen zeigte sich, daß sich Kaninchen je nach Rasse und Ernährungszustand gegen wiederholte Injektionen von 1 ccm einer 0,01- bis 0,02proz. Strychninlösung nach vorangegangenem zweitägigen Hungern recht verschieden verhalten. Bei dem Kaninchen Nr. 26 der „Schwarzloh"-Rasse zog sich der Versuch 3 Tage lang hin, und es waren 62 Injektionen erforderlich, während das Albinokaninchen Nr. 37 schon am zweiten Injektionstage nach 29 Injektionen viel gründlicher entglykogenisiert war als Nr. 26. Der Starreeintritt erfolgte beim Tier Nr. 26 nach 5 und bei Nr. 37 nach 3 Minuten. Die Analyse ergab alle Anhaltspunkte für eine typische Erschöpfungs-Totenstarre (siehe Tabelle II).

In ähnlicher Weise wie durch Strychnin läßt sich nach *Lee* und *Harold*[4]) durch Phlorrhizin eine frühe Totenstarre einleiten, die auf Kohlehydratentzug beruht und wie jede frühe Starre zur alkalischen Reihe gehört.

II. Entglykogenisierung des Muskels durch Nahrungsentzug.

a) Bei Krankheit.

Nach lang anhaltenden Erkrankungen[5]) mit unzureichender Nahrungszufuhr schwindet das Glykogen im Muskel und es tritt die alkalische Starre ein. Über den raschen Eintritt der Starre bei erschöpfenden Krankheiten berichtet *Fodéré*[6]) „Wir sehen Leute, die plötzlich an einer inneren Blutung oder an dem Aufbrechen eines Lungengeschwürs sterben, augenblicklich eine extreme Starre bekommen, die sie auf dem Stuhle, wo sie gestorben sind, sich sitzend halten läßt, als wenn sie nicht tot wären".

b) Durch Insulin.

Ich kann hier auf die früheren Mitteilungen aus unserem Laboratorium[7]) verweisen, doch möchte ich über die Wirkung des Pankreashormons noch folgendes bemerken:

[1]) *O. Neubauer* im Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. **4**, 9, 601.

[2]) *Frentzel*, Arch. f. d. ges. Physiol. **56**, 273, 1894.

[3]) *O. Simon*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 315, 1902.

[4]) *Lee* und *Harold*, Arch. ital. de biol. **36**, 75, 1901; zitiert nach *O. Riesser*, Handb. d. Physiol. **8**, 1, 248.

[5]) *Oppenheim* und *Wacker*, a. a. O.; *Wacker*, Arch. f. d. ges. Physiol. 174 (1919), S. 432 unter 6.

[6]) *Fodéré*, Lehrb. d. gerichtl. Med. **2**. In etwas mangelhafter Übersetzung wörtlich zitiert nach *Baumann*, Zeitschr. f. gerichtl. Med. 1923, S. 655.

[7]) *H. Baur*, *R. Kuhn*, *L. Wacker*, a. a. O.; *R. Kuhn* und *H. Baur*, Münch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 17, S. 541.

Tötet man ein Kaninchen nach fünftägigem Hunger (Versuch 23, Tabelle I), so ist der Muskel stark sauer. Stirbt ein Kaninchen am 39. Hungertage an einer interkurrenten Darmstörung (Versuch 12, Tabelle I) und ergibt die Sektion noch ein Fettdepot (am Nacken), so entsteht trotz der langen Hungerperiode noch eine saure Starre, wenn auch nicht so sauer wie bei Versuch 23. Es wird demnach im Hunger so lange noch Fett verfügbar ist, aus diesem das Kohlehydrat erzeugt, welches als Milchsäurequelle erforderlich ist. Tötet man aber ein Kaninchen am fünften Hungertage durch Injektion von 10 bis 20 Insulineinheiten, so resultiert eine ausgesprochene alkalische Starre, weil trotz der Anwesenheit eines reichlichen Fettdepots dem Muskel kein Kohlehydrat zugeführt wurde.

Diese Ergebnisse sprechen sehr im Sinne *Laufenbergers*[1]), daß das Insulin die Kohlehydratbildung oder vielleicht besser den Fettabbau blockiert, und stehen ganz im Einklang mit dem nachgewiesenen Glykogenschwund[2]) im Muskel unter Insulineinfluß und der therapeutischen Verwendung des Insulins zu Mastkuren. Neuere Untersuchungen von *H. Edelmann* (a. a. O.), *Bissinger* und *Lesser*[3]), *Best* und Mitarbeiter lassen jedoch zweifellos erkennen, daß geringe Insulinmengen gerade die umgekehrte Wirkung auszuüben vermögen; sie können Glykogen im Muskel speichern. Die von uns verwendeten Insulinmengen sind sehr hoch dosiert, weil sie den Tod herbeiführen sollen. Maßgebend für die eigentliche Hormonwirkung werden natürlich nur solche Mengen sein, welche den intra vitam vorkommenden Verhältnissen am nächsten kommen.

Auf ähnlicher Basis, wie durch Insulin, ist auch mit Synthalin, einem neuen Antidiabeticum, eine alkalische Totenstarre zu erreichen[4]).

c) Durch Hunger.

Die Möglichkeit, dem Muskel das Glykogen durch Hunger zu entziehen, ist seit langer Zeit bekannt (a. a. O.), ebenso wie die Existenz der alkalischen Starre (*Kühne*, a. a. O.). *Kühne* wurde durch die unerwartete alkalische Reaktion irregeführt und glaubte, daß Säuerung und Starre voneinander unabhängige Prozesse sind (Kühnes physiol. Chem., S. 285), da ihm die Möglichkeit des Nachweises geringer Milchsäuremengen fehlte. Erst in unserem Laboratorium (l. c.) wurde der Beweis erbracht, daß auch bei der alkalischen Starre die Milchsäure das ursächliche Moment ist.

Die Hungerversuche wurden ausschließlich an Kaninchen vorgenommen. Die mehr oder weniger gut genährten Tiere starben nach 15 bis 48 Hungertagen (im Mittel nach 32 Tagen) und verloren 46 bis 61 Proz. (im Mittel 53,1 Proz.) ihres ursprünglichen Gewichts, dabei erfolgte der Tod unter ähnlichen, wenn auch schwächeren opisthotonusähnlichen Krämpfen wie beim Insulintod. Beim Hungern nehmen die weißen Muskeln eine rötere Färbung an, so daß es oft schwer ist, die früher weißen Muskeln wiederum herauszufinden.

---

[1]) *Laufenberger*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 42, 570, 1924; Klin. Wochenschr. 3, 264, 1924.

[2]) *Staub*, „Insulin", a. a. O.

[3]) *Bissinger* und *Lesser*, *Best* und Mitarbeiter, Naturwissensch. 1926, Nr. 46, S. 1020.

[4]) *H. Baur*, Vortrag in der Sitzung vom 28. Januar 1927 des ärztlichen Vereins München; *Frank*, *Nothmann*, *Wagner*, Klin. Wochenschr. 1926, Nr. 45, S. 2100; *Minkowski*, ebendaselbst 1926, Nr. 45, S. 2107.

Hungeracidose. Bekanntlich stellt sich im Hunger, wenn der Energiebedarf ausschließlich durch Fett bestritten wird, eine Acidosis ein. Diese Erscheinung steht in scheinbarem Widerspruch zur alkalischen Reaktion der Muskeln nach dem Hungertode. Die Acidosis wird jedoch nur so lange bestehen, als noch Fett abgebaut werden kann, ist dieses aufgezehrt, so versiegt die Quelle der Ketonsäuren und der Rest derselben wird — ebenso wie das Lactat — zu Alkalibicarbonat oxydiert. Dann ist der Zeitpunkt des prämortalen Eiweißabbaues gekommen, der unter Desamidierung von Aminosäuren verläuft.

Unterscheidungsmerkmale der sauren und alkalischen Totenstarre.

Die wesentlichsten Unterschiede liegen natürlich im Glykogengehalt der Muskeln im Moment des Todes und in dem Vermögen der Produktion großer oder geringer Mengen von Milchsäure, Verhältnisse, die ja den Ausgangspunkt dieser Untersuchungen bilden. Von der Menge der gebildeten Milchsäure sind die anderen chemischen Eigenschaften abhängig, wie sie in Tabellen III und IV zum Ausdruck kommen.

Im weißen glykogenhaltigen Kaninchenmuskel wurden 24 Stunden p. m. im Mittel 0,705 Proz., im roten 0,533 Proz. Milchsäure (als Lactat) ermittelt, während der entsprechende Muskel der Hungertiere nur 0,043 bzw. 0,046 Proz. dieser Säure enthielt. Der weiße Muskel enthält demnach in der sauren Starre, 24 Stunden p. m., 16,4mal mehr, der rote 11,5mal mehr Milchsäure als der entsprechende Muskel nach dem Hungertode. Dieser große Unterschied kommt in gleicher Weise in den Indexzahlen zum Ausdruck. Während beim weißen glykogenhaltigen Muskel in der Starre die sauren Valenzen das 6,3fache, beim roten das 4,0fache der alkalischen Bestandteile betragen, überwiegen im Hunger die alkalischen die sauren beinahe um das Doppelte (0,56 weiß und 0,60 rot). Viel weniger deutlich sind diese Veränderungen an der H'-Konzentration des Muskelextraktes zu erkennen, weil die Pufferung große Ausschläge verhindert. So beträgt bei der sauren Starre des weißen Muskels $p_H = 5,99$ bis 6,11 gegenüber 7,10 im Hunger, und beim roten 6,21 bis 6,43 bzw. 7,04. Nach *H. Schade* und Mitarbeitern (a. a. O.) ist die H'-Konzentration des lebenden ruhenden Muskels $p_H = 7,3$, die des ermüdeten 6,6 bis 6,7. Auch hieraus ist wiederum die Ähnlichkeit zwischen dem Muskel der alkalischen Starre mit dem frischen normalen Muskel zu erkennen. Die Alkaleszenz des Hungermuskels nach dem Starreeintritt nach 24 Stunden p. m. ist mit einem Index von 0,56 bzw. 0,60 allerdings niedriger als die des normalen frischen Muskels sofort bzw. 10 Minuten nach dem Tode (Index 1,23 bis 1,40). Dies entspricht nicht den normalen Verhältnissen im Augenblick des Todes. Die Gründe hierfür wurden schon früher und unter Methodik erläutert. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen alkalischer und saurer Starre ist das Verhalten der Alkalialbuminate (Alkaliproteine). Durch die große Milchsäureproduktion wurden in einem Falle die an Alkali gebundenen Eiweißkörper im Muskel niedergeschlagen und können daher bei der Extraktion nicht in Lösung gehen, im anderen Falle beim frischen normalen und beim Hungermuskel reicht die geringe Milchsäuremenge zur Zerlegung nicht aus und wir finden die Albuminate in reichlicher Menge im Extrakt. Es stehen demgemäß nach Tabelle III 0,006 bzw. 0,140 Proz. Albuminateiweiß bei der sauren Form, 1,256 und 1,241 Proz. der alkalischen Starre gegenüber. Im frischen normalen Muskel

ist der Gehalt mit 0,813 bzw. 0,805 Proz. aus erwähnten Gründen etwas niedriger.

Aus einem Gehalt an Albuminateiweiß des frischen weißen Hungermuskels von 1,536 und 1,602 Proz. beim roten ergibt sich bei einem Trockengehalt von 24 Proz. des Kaninchenmuskels, daß die Eiweißkomponente (ohne das zugehörige Alkali) etwa 6,5 Proz. des Gesamtmuskelgewichts ausmacht, wovon nach Eintritt der alkalischen Starre noch etwa 5,1 Proz. an Alkali gebunden ist, während sich bei der sauren Starre nur noch Bruchstücke in ionisiertem Zustande vorfinden. Dieser hohe Gehalt an ionisiertem Eiweiß bei der Erschöpfungstotenstarre mag die Ursache sein, weshalb sich die alkalische Starre rascher löst als die saure.

Die graphische Darstellung in Tabelle IV bezieht sich auf die mittleren Werte von Alkaleszenz, Acidität und Milchsäurebildung, ausgedrückt in n/10 Alkali bzw. Säure 24 Stunden nach dem Tode im weißen und roten Kaninchenmuskel. Die an Alkali gebundenen Eiweißkörper sind nicht direkt mit den obigen Größenverhältnissen vergleichbar. 1 mm entspricht 0,01 g Eiweiß trocken.

Wie erwähnt, ist der Zustand des Muskels in der alkalischen Starre jenem des überlebenden frischen Muskels ähnlich. Wenn man die Säurebildung, wie dies allgemein geschieht, als die treibende Kraft zur Starrekontraktur auffaßt, sollte man erwarten, daß bei vorwiegender alkalischer Reaktion keine Totenstarre möglich ist, weil der frische Muskel auch nicht kontrahiert ist und erst erstarrt, wenn die alkalische Reaktion der sauren Platz gemacht hat. Beispielsweise ist der frische, überlebende, weiße Muskel gemäß Tabelle I bei einem Index von 1,4 und einem Milchsäuregehalt von 0,39 Proz. noch nicht in den Starrezustand übergegangen, während nach Tabelle II der weiße Hungermuskel bei einem Index von 0,56 und einem Säuregehalt 0,04 Proz., d. h. bei annähernd dem zehnten Teil der Säure, sich seit 24 Stunden in Starre befand. Man muß daher aus der Existenz einer alkalischen Starrekontraktur den Schluß ziehen, daß die alkalischen Valenzen allein nicht die Ursache der Reversion der Muskelkontraktion sein können. Es müssen für die Rückkehr in den Erschlaffungszustand noch andere Faktoren in Frage kommen, auf die ich in einer späteren Mitteilung zurückzukommen hoffe[1]).

Die Alkalialbuminate (Alkaliproteine) des Muskels.

Hammarsten[2]) schreibt in seinem Lehrbuch S. 411: „Die Lehre von den Eiweißstoffen des Muskels, des lebenden sowohl wie des toten, ist sehr unklar und weiterer Forschung bedürftig. Auch die Nomenklatur ist eine sehr verwickelte geworden.“ Was für die Muskeleiweißkörper im allgemeinen gilt, trifft in hohem Maße auch für die Alkalialbuminate zu. Letztere spielen als Puffersubstanzen neben den Phosphaten und Carbonaten eine bedeutende Rolle; darüber hinaus mißt ihnen *Hill*[3]) in seiner Gelatinierungstheorie bei der Fällung durch Milchsäure eine Rolle bei der Verkürzung des Muskels bei.

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1927 (im Druck).

[2]) *Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chem. 11. Aufl., 1925.

[3]) Gelatinierungstheorie, vgl. *Meyerhof*, Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. 8, 1, 536.

Was die Nomenklatur der an Alkali gebundenen Eiweißkörper betrifft, so finden wir sie in der alten Literatur unter dem Namen *Kaliumalbuminat*. Die Alkalialbuminate des Fischmuskels bezeichnet *Fürth* als Myoproteid.

In der neueren Literatur werden sie — nach dem Vorgang *Hills* und *Meyerhofs* — als *Alkaliproteine* und in der physikalischen Chemie als *ionisiertes Eiweiß* bezeichnet. Eine dringende Notwendigkeit, neue Bezeichnungen einzuführen, ist nicht ersichtlich, soweit es sich nicht um allgemeine Begriffe wie ionisiertes Eiweiß handelt.

Nach *Kühne*[1]) ist das Kaliumalbuminat an der Fällbarkeit der Eiweißkomponente aus dem Muskelserum mit Essigsäure zu erkennen. Da *Kühne* bereits bekannt war, daß das Kaliumalbuminat durch die im Muskel gebildete Milchsäure (a. a. O., S. 285) zerlegt wird, empfiehlt er, bei der Herstellung des Muskelplasmas bzw. Serums in der Kälte zu arbeiten, eine Notwendigkeit, die ja in neuerer Zeit zuerst wiederum durch die Arbeiten von *Fletcher* bestätigt wurde. Das Wesentlichste des Kälteverfahrens ist, die Wirkung der Fermente auszuschalten, was bekanntlich auch durch Eintragen in kalten Alkohol oder kochendes Wasser erreicht werden kann.

Gegenüber diesen weit und breit bekannten Tatsachen stellt *Fürth* als Referent der Chemie des Muskelgewebes in Oppenheimers Handb. **4**, 2. Aufl., 299, 1925, die Existenz des Kaliumalbuminats in Abrede. Andererseits gibt er neuerdings in seinem ein Jahr später erschienenen zweiten Heft des Lehrbuchs der physiol. u. pathol. Chem. **1**, 211 und 258, 1926, die Möglichkeit des Vorkommens von Alkaliproteinen zu, die durch die Milchsäure entionisiert werden können. Die mit dem Sachverhalt und der Nomenklatur nicht vertrauten Leser seines Lehrbuches können aus diesen Darlegungen nicht entnehmen, daß das längst bekannte Kaliumalbuminat *Kühnes* und die Alkaliproteine bzw. das ionisierte Eiweiß der physikalischen Chemiker wesensgleiche Substanzen sind. Die irrtümliche Auffassung *Fürths* geht auf seine frühere Muskelforschung zurück. Sie rührt in erster Linie daher, daß er *Kühnes* Vorschrift, bei der Plasmabereitung in der Kälte zu arbeiten, als zwecklos ignorierte. Seine Anschauung hierüber gibt er im Arch. f. exper. Pathol. **36**, 234 mit folgenden Worten kund: „*Kühne* legte großen Wert darauf, daß die Plasmabereitung bei niedriger Temperatur durchgeführt werde... Nach einer Anzahl orientierender Versuche sah ich mich veranlaßt, auf die Anwendung von Kälte ganz zu verzichten und von dieser erheblichen Komplikation der Versuchsanordnung abzustehen, da sich das mit dem Kälteverfahren bereitete Plasma nicht anders verhielt, als das ohne Kälteanwendung hergestellte."

[1]) *Kühne*, Untersuchungen über das Protoplasma, S. 12. Leipzig 1864. Lehrb. d. physiol. Chem., S. 277. Leipzig 1868.



Dadurch sind ihm — wie dies auch *Wöhlisch* und *Schriever*[1]) bestätigen — die Alkalialbuminate entgangen und nur bei Kaltblütern, bei denen sich der Milchsäurebildungsprozeß sehr langsam vollzieht, gelang ihm der Nachweis.

Die von mir durch Auskochen des Muskels isolierten Alkalialbuminate hält *Fürth* für Kunstprodukte[2]), die in der Hitze entstanden seien.

---

[1]) *Wöhlisch* und *Schriever*, Zeitschr. f. Biol. 83, 277, 1925.

[2]) *Fürth* hat die Polemik über die Alkalialbuminate sowie die Säureeiweißquellungstheorie und Kohlensäuretheorie der Muskelkontraktion mit einigen Zusätzen auf Oppenheimers Handbuch der Biochemie und sein Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie übertragen. Zur Abwehr sehe ich mich genötigt, nochmals auf dieses Thema zurückzukommen und die Gründe hervorzuheben, die *Fürth* veranlaßten, die Existenz der Alkalialbuminate bis in die jüngste Zeit zu bestreiten.

Durch die *Kühne*schen Untersuchungen war das Vorkommen des Kaliumalbuminats erwiesen. Diese Tatsache ist *Fürth* bei der Bearbeitung der Muskeleiweißkörper entgangen, weil er sich nicht an die Vorschrift *Kühnes* (und *Halliburtons*) hielt, in der Kälte zu arbeiten (Ergebn. d. Physiol. 1, 115, 1902). Durch die mechanischen Insulte beim Auspressen des Muskels, die häufig noch mit Temperaturerhöhung einhergehen, wurden die Alkalialbuminate durch die entstehende Milchsäure restlos in die Eiweißkomponente und Alkalilactate zerlegt. In dieser Form ist es schwer, die Eiweißkomponente von den übrigen Eiweißkörpern zu isolieren. Auf diese Weise bildete sich bei *Fürth* gegenüber *Kühne* und *Halliburton* (Myoalbumose) die Meinung, daß sich im Muskel nur zwei Eiweißkörper — das Myosin und Myogen — befänden (Ergebn. d. Physiol. 1, 117, 1902 und 17, 379, 1918). Nur im Muskelsaft von Kaltblütern fand er einen löslichen, in der Hitze nicht koagulablen Eiweißkörper, den er Myoproteid nannte und der zu den Alkalialbuminaten im Sinne *Kühnes* zählt (Handb. d. Biochem. II, 2, 1. Aufl., S. 247 bis 249, 1909).

Das Unterlassen der Anwendung von Kälte ist auch die Ursache der Meinungsunterschiede über das Auftreten und den Einfluß der Milchsäure auf die Muskeleiweißkörper zwischen *Fürth* einerseits und *Halliburton*, *Stewart* und *Sollmann* und *C. Schipiloff* andererseits gewesen, denn *Fürth* begann seine Untersuchungen erst dann, wenn sich die Wirkung der Milchsäurebildung bereits vollzogen hatte (Ergebn. d. Physiol. 1, 115, 118).

Auf diesen experimentellen Unterlagen baute *Fürth* eine Theorie auf, wonach die Totenstarre und Muskelkontraktion auf einer Säurequellung des Eiweiß beruhten, die, unterstützt durch die modern gewordene kolloidchemische Anschauungsweise, viele Gläubige fand.

Meine durch Experimente gestützte Ansicht (diese Zeitschr. 75, 101, 1916), daß die entstehende Milchsäure durch die Puffersubstanzen, zu denen auch das Kaliumalbuminat zählt, sofort neutralisiert wird, steht in direktem Gegensatz zur *Fürth*schen Lehre. Um die Wirkung der Fermente auszuschalten, habe ich sie durch Kochen des Muskels zerstört, und weil die Alkalialbuminate wasserlöslich und hitzebeständig sind, mußte ich sie im Filtrat des frischen Muskels wiederfinden. Die Mengen sind ziemlich groß, sie betragen etwa 1,6 Proz. des frischen (Kaninchen-) Muskels, der einen Trockengehalt von 24 Proz. besitzt, d. h. es sind etwa 7 Proz. des gesamten Muskeleiweiß als Albuminat vorhanden. Sie sind demnach wesentlich

Er kommt dadurch in Widerspruch mit den *Kühne*schen Ergebnissen und mit seinen eigenen früheren Angaben (s. die Fußnote). Wäre die

---

größer, als *Fürth* in seinem Lehrbuch **1**, 212, 1926 seinen Lesern berichtet. Gemäß dem Vorgange *Kühnes* bezeichnete ich sie als Kaliumalbuminate.

Die Existenz von Alkaliverbindungen des Eiweißes im Muskel schließt die Säurequellung im Sinne *Fürths* aus, denn es kann sich höchstens um eine Fällung (*Schipiloff*) oder Entionisierung handeln. Daher sucht *Fürth* meine Angaben — allerdings in etwas ungewöhnlicher Weise — zu widerlegen: Während er selbst das Alkalialbuminat des Fischmuskels (Myoproteid) aus dem *aufgekochten* Muskelserum durch Essigsäure gefällt und als einen Eiweißkörper sui generis (Ergebn. d. Physiol. **17**, 447; Arch. f. exper. Pathol. **36**, 259 bis 262, 1895) bezeichnet hat, betrachtet er meine auf demselben Wege isolierten Kaliumalbuminate — unter Ignorierung der *Kühne*schen Angaben — als Kunstprodukte, die beim Kochen entstanden seien (Ergebn. d. Physiol. **17**, 447). Man fragt sich unwillkürlich, mit welchem Recht *Fürth* meinen Produkten eine Ausnahmestellung zuweisen will, nachdem sie doch nach dem gleichen Verfahren wie die Myoproteide isoliert sind. Er muß wohl selbst die Inkonsequenz einer solchen Beweisführung erkannt haben, sonst würde er in seinen allerneuesten Referaten nicht vorschlagen, die Myoproteide jetzt auch als Kunstprodukte aufzufassen (Oppenheimers Handb. **4**, 2. Aufl., S. 299). Aber dieser Ausweg ist recht unglücklich gewählt, denn *Wöhlisch* und *Schriever* (Zeitschr. f. Biol. **83**, 278, 1925) bestätigen die frühere Ansicht *Fürths*, daß das Myoproteid ein genuiner, in der Hitze beständiger Eiweißkörper ist, weil sein isoelektrischer Punkt konstant bleibt.

Es ist eine sehr unnütze Beschäftigung, heute noch über die Existenz oder Nichtexistenz der Alkalialbuminate zu polemisieren, wenn man sich bewußt ist, daß Alkalialbuminate und Alkaliproteine identische Substanzen sind; als Beispiel, wie vielseitig dieses Gebiet bearbeitet ist, verweise ich auf den Artikel *Meyerhofs* in dem Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. **8**, 520, über die Neutralisationswärme der Alkalialbuminate (= Entionisierungswärme der Alkaliproteine).

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich, daß *Fürth* niemals zur Aufstellung der Säurequellungstheorie hätte gelangen können, wenn er die Errungenschaften zahlreicher Vorgänger, insbesondere aber *Kühnes*, zu würdigen gewußt hätte und dessen Angaben über die alkalische Totenstarre beim Hungertod berücksichtigt hätte.

Bevor ich dieses Thema — wie ich hoffe, für immer — schließe, muß ich noch auf einige Bemerkungen in *Fürths* Lehrb. d. physiol. u. pathol. Chem. **1**, Heft 2, S. 279, 1926 über die Bedeutung der Kohlensäure bei der Muskelkontraktion (Berl. klin. Wochenschr. 1917, Nr. 7; Pflügers Arch. **168**, 147, 1917) zurückkommen. Er schildert auf S. 263/264 die Untersuchungen *Fletchers* über die Entstehung der Kohlensäure im Muskel und geht auf S. 279 dazu über, die Bedeutung der Anwesenheit der Kohlensäure für die reguläre Funktion (nach *Mansfeld* und *v. Szent Györgyi*, Pflügers Arch. **184**, 236, 1920) mancher muskulärer Mechanismen zu beschreiben. Nachdem er weiter noch der Befunde *Hürthles* und seines Mitarbeiters *Straube* (Pflügers Arch. **194**, 574, 1922) gedacht hat, daß getrocknete, jahrelang aufbewahrte Muskeln des Hydrophilus beim Befeuchten mit Ringerlösung, unter dem Einfluß des Natriumbicarbonats, sich wiederum zu kontrahieren vermögen, schließt er sich der Meinung der erwähnten

*Fürth*sche Meinung richtig, so müßten sich die *Kühne*schen Albuminate beim Kochen erst zersetzen und dann in neuer Form an Alkali gebunden im Extrakt erscheinen. Dies ist jedoch bei niedrig molekularen Eiweißverbindungen ein unwahrscheinlicher Vorgang, und selbst, wenn es so wäre, würde es für die quantitative Bestimmung im Extrakt gleichgültig sein. Die Hitzebeständigkeit derartiger Verbindungen ist aber von *Wöhlisch* und *Schriever* (a. a. O., S. 278) durch die Konstanz des isoelektrischen Punktes erwiesen.

Theoretisches.

Bei dem innigen Zusammenhang, der zur Totenstarre führenden chemischen Vorgänge mit jenen für die physiologische Kontraktion maßgebenden ist es notwendig, die Theorien über die Entstehung der Starre und physiologischen Kontraktion gleichzeitig zu besprechen. Ich muß zu diesem Zwecke auf meine früheren Ausführungen zurückgreifen: Die chemischen Vorgänge beim arbeitenden und beim überlebenden Muskel lehren uns dreierlei:

Es bildet sich aus Lactacidogen und Glykogen Milchsäure. Mit dem Entstehen derselben entweicht aus dem absterbenden und arbeitenden Muskel Kohlensäure[1]). Gleichzeitig findet eine Entionisierung der Alkalialbuminate (Alkaliproteine) statt. Alle diese Prozesse sind mit Sicherheit nachgewiesen und sie verlaufen zu gleicher Zeit. Diese Tatsachen können nicht ignoriert werden. Jeder einzelne der aufgeführten Vorgänge hat im Laufe der Zeit zu einer zugehörigen Kontraktionstheorie[2]) geführt. Diese sind: Osmotische Theorie, Kohlensäuretheorie, Gelatinierungstheorie. Schon aus den Titeln der Theorien

---

Autoren — über die Bedeutung der Kohlensäure als wesentlichen Faktor der Verkürzung des lebenden Muskels an und bestätigt damit auch meine in der oben erwähnten Kohlensäuretheorie geäußerten Anschauungen.

Es kann sich somit nur um die mechanische Vorstellung der Kraftübertragung handeln, die das Mißfallen *Fürths* erregt. Wenn man der Kohlensäure schon eine Bedeutung zumißt, so kann diese doch bloß darin zu suchen sein, daß sie — wie irgendwelche andere hier in Frage kommende Kraft — innerhalb des Muskels einen Druck verursacht. Stellt man sich vor, daß diese Drucksteigerung innerhalb zylindrischer oder länglicher blasenförmiger Fibrillenabschnitte erfolgt, so werden diese — unter gleichzeitiger Verdickung bestrebt sein, die Kugelform anzunehmen. Mit dieser Vorstellung befinde ich mich im Einklang mit dem berühmten Kinematiker *Reuleaux*. Sie ist auch weiter vereinbar mit der makroskopisch wahrnehmbaren, eigenartigen Gesamterscheinung beim kontrahierten Muskel, die sich durch Verdickung unter Verkürzung vollzieht (vgl. Pflügers Arch. **169**, 492, 1917).

[1]) *Fletcher*, Journ. of Physiol. **23**, 54, 1898; *Wacker*, diese Zeitschr. **79**, 118, 1917.

[2]) Vgl. dazu *Meyerhof*, Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. **8**, 532.

ist das Bestreben ersichtlich, die Muskelkontraktion auf einen einzigen Vorgang zurückzuführen, obschon es sich um dreierlei Prozesse handelt. Jeder der drei Vorgänge hat seine Berechtigung und ist mit Recht Gegenstand einer Theorie. Sobald man aber dazu übergegangen ist, die Berechnung des Wirkungsgrades auf Grund einer einzigen Theorie vorzunehmen, ist man auf einen toten Punkt gekommen, weil der experimentell ermittelte Nutzeffekt der Muskelmaschine von 25 bis 30 Proz. nicht mit der Theorie in Einklang zu bringen war. Es ließ sich auf Grund der Theorie ein so hoher Nutzeffekt nicht errechnen und doch wird man keiner der genannten Theorien auf Grund der chemischen und thermischen Forschungsergebnisse eine Berechtigung absprechen können. *Es besteht aber durchaus kein zwingender Grund, die gleichzeitig sich vollziehenden Erscheinungen in ihrer Gesamtheit nicht für die Entstehung der Starre bzw. Kontraktion verantwortlich zu machen,* denn es läßt sich nicht leugnen, daß beim Zerfall von Glykogen und Lactacidogen in Milchsäure und Phosphat ein osmotischer Druck entstehen muß, man wird auch nicht in Abrede stellen können, daß die beim Kontraktionsakt entstehende Kohlensäure aus dem Muskel, ähnlich wie bei der Hefegärung, nur dann entweichen kann, wenn sie sich unter einem Überdruck befindet. Wäre kein solcher vorhanden, so müßten die CO_2-Moleküle nach dem Gesetz der Trägheit im Muskel verweilen. Mit diesem osmotischen Drucke der Milchsäure und Phosphate, dem Gas- oder osmotischen Druck der Kohlensäure würde sich jener Druck vereinigen, der bei der Entionisierung des Kaliumalbuminats (Alkaliproteins) entsteht, falls es gelingt, auf diese Weise eine Druckbildung mit Sicherheit festzustellen.

Auf die Bedeutung der Entionisierung des Kaliumalbuminats für die Fixierung des Muskels bei der Totenstarre habe ich schon vorher hingewiesen.

Aus diesem Grunde glaube ich, meine früheren Anschauungen[1]) über das Zustandekommen der Totenstarre durch das Zusammengreifen verschiedener Vorgänge aufrecht erhalten zu müssen, zumal die alkalische Totenstarre damit in Einklang zu bringen ist. Diese Erscheinungen sind: Osmotischer Druck durch Molekülzerfall, Gasdruck oder osmotischer Druck der Kohlensäure und Fixierung des Muskels durch Abscheidung der Eiweißkomponente der Alkalialbuminate (Alkaliproteine).

Zusammenfassung.

1. Der Ernährungszustand des Muskels im Augenblick des Todes ist maßgebend für den Umfang der zur Totenstarre führenden chemischen Prozesse.

[1]) Diese Zeitschr. 75, 136, 1916.

2. Der glykogenhaltige Muskel liefert durch reichliche Milchsäurebildung ein saure, der glygogenarme infolge spärlicher Säureproduktion eine alkalische Totenstarre.

3. Im Tierexperiment kann man die alkalische Totenstarre durch Entglykogenisierung des Muskels erzeugen. Dieser Erschöpfungszustand wurde durch Hunger, Insulin und Injektion zahlreicher kleiner Strychnindosen erreicht. Die alkalische Totenstarre kann daher auch als Erschöpfungstotenstarre bezeichnet werden.

4. Die bekannte Erscheinung, daß sich weißer und roter glykogenhaltiger Muskel (beim Kaninchen) verschieden verhalten, wurde bestätigt. Innerhalb 24 Stunden nach dem Tode produzierte der weiße Muskel 0,70 Proz. Milchsäure, der rote dagegen nur 0,53 Proz.

5. Der Grund, weshalb der weiße Muskel mehr Milchsäure bilden kann als der rote, ist in der besseren Pufferung (größeren Pufferungsbreite) des ersten zu suchen.

6. Im extremsten Falle der alkalischen Starre (Hungertod) vermag der weiße Muskel nur 0,043 und der rote 0,046 Proz. Milchsäure zu bilden.

7. Dem Milchsäuregehalt entsprechend, ändert sich der Säurealkaliindex (Verhältnis der alkalischen zu den sauren Bestandteilen) und der Gehalt an Albuminaten im Extrakt. So enthält der alkalische Muskel in der Erschöpfungsstarre noch reichliche Mengen ionisiertes Eiweiß, der saure nur sehr wenig.

8. Die Menge des im frischen alkalischen Muskel an Alkali gebundenen Eiweißes berechnet sich — bei einem Trockengehalt der Kaninchenmuskeln von 24 Proz. — auf etwa 6 bis 7 Proz.

9. In Totenstarre befindliche Muskeln mit einem Säurealkaliindex > 1 sind der sauren, solche mit einem Index < 1 sind der alkalischen Starre zuzurechnen.

10. Die Erschöpfungstotenstarre tritt (beim Kaninchen) innerhalb weniger Minuten, die saure je nach Umständen erst nach mehreren Stunden ein.

11. Während die saure Starre bei einem Index von 1,4 noch nicht in Erscheinung trat, war die alkalische bei einem Index von 0,56 schon vorhanden. Daraus ist zu schließen, daß für die Reversion der Muskelkontraktion nicht die alkalischen Valenzen allein maßgebend sind.

Theoretisches.

12. Die Totenstarre läßt sich, wie früher schon hervorgehoben, durch das Zusammengreifen von drei Erscheinungen erklären: Osmotischer Druck durch Molekülzerfall, osmotischer oder Gasdruck der Kohlensäure und Fixierung des Muskels durch die Eiweißkomponente der Alkalialbuminate (Alkaliproteine).

13. Jedem der drei erwähnten Vorgänge im absterbenden Muskel entspricht je eine Theorie der Muskelkontraktion. Diese Theorien sind: Osmotische Theorie, Kohlensäuretheorie und Gelatinierungstheorie.

14. Die Gleichzeitigkeit der diesen Theorien zugrunde liegenden chemischen Prozesse im Muskel berechtigt zu der Vorstellung, daß alle drei Vorgänge gemeinsam zur Kontraktion beitragen.

Zur Methodik.

Im Kochextrakt der Muskeln wurden sogleich nach dem Tode und 24 Stunden später ermittelt: Milchsäuregehalt, Verhältnis der sauren zu den alkalischen Bestandteilen (= Säurealkaliindex), Menge der bei der Neutralisation mit n/10 ClH fällbaren Eiweißkörper, H-Ionenkonzentration. In einigen Fällen Glykogen in getrennter Portion.

Herstellung der Muskelextrakte. Um die Vorgänge in der Muskulatur des Kaninchens nach dem Tode in ihrer Entwicklung zu verfolgen, war es erforderlich, die Kochextrakte nicht nur sofort nach dem Tode, sondern auch nach 24 Stunden zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurden die Muskeln des einen Hinterlaufs sofort entnommen, während die des anderen 24 Stunden bei Zimmertemperatur in unversehrtem Zustande erhalten wurden, um erst dann herauspräpariert zu werden. Da die chemischen Prozesse im frischen Warmblütermuskel sehr rasch verlaufen, ist raschestes Arbeiten erforderlich, um die Fermente durch Eintragen in kochendes Wasser unschädlich zu machen. Immerhin verstreichen nahezu 10 Minuten, bis die roten und weißen Muskel isoliert, gewogen und zum Eintragen in kochendes Wasser bereit gehalten sind. Die Milchsäurewerte der sofort entnommenen Muskeln unserer Tabellen sind daher zu hoch bzw. sie entsprechen dem Zustand des Muskels etwa 10 Minuten nach dem Tode und nicht dem im Moment des Todes. Entsprechend dem erhöhten Milchsäurewert ist auch der Säurealkaliindex zu groß und die Menge der aus dem Extrakt bei der Neutralisation mit Säure fällbaren Eiweißkomponente zu niedrig. Wenn man den Milchsäuregehalt und den Index usw. in getrennten Muskelpartien, die nacheinander abgewogen werden, bestimmt, besteht die Gefahr, keine einheitlichen Resultate zu erhalten, weil beispielsweise die Milchsäurebildung vor dem Zerreiben in kaltem Alkohol schon weiter oder weniger weit vorgeschritten sein kann, als in der in kochendes Wasser eingetragenen Portion. Wir haben es daher vorgezogen, alle späteren Bestimmungen (mit Ausnahme des Glykogens) in ein und demselben Kochextrakt durchzuführen.

Es wurden 16 g weißer bzw. roter Muskel auf einer gut ziehenden Handwage (beim frischen Muskel möglichst rasch) abgewogen und in haselnußgroßen Stückchen in etwa 70 ccm bereit gehaltenes kochendes Wasser eingetragen und eine Viertelstunde lang gekocht. Dann wurde der wässerige Teil durch ein Faltenfilter abgegossen, der Muskelrückstand mit der Schere gut zerkleinert und weitere dreimal in angegebener Weise unter Zusatz von Siedesteinchen je eine Viertelstunde ausgekocht. Zum Schluß wird das Filter mit heißem Wasser nachgewaschen und die vereinigten und gekühlten Extrakte auf 320 ccm Flüssigkeitsvolumen aufgefüllt. Nach dem Durchmischen werden 20 ccm entsprechend 1 g Muskel zur Bestimmung der Milchsäure herauspipettiert. Der Rest wird in zwei



gleiche Teile à 150 ccm geteilt und darin die alkalischen und sauren Bestandteile ermittelt (vgl. diese Zeitschr. 75, 119, 1916; Berl. klin. Wochenschrift 1919, Nr. 42, S. 990). Der Extrakt des roten Muskels war nach dem Erkalten immer etwas trüber als der des weißen.

Milchsäurebestimmung. Die für die Milchsäurebestimmung entnommenen 20 ccm Kochextrakt wurden in 80 ccm Alkohol (94proz.) eingetragen und mit n/10 Salzsäure neutralisiert. Die Menge der hierzu erforderlichen Salzsäure berechnet man zweckmäßig aus dem titrimetrisch (unter Zuhilfenahme von Methylrot) ermittelten Alkaleszenzwert in den vorerwähnten 7,5 g Muskel entsprechenden 150 ccm Extrakt. Nach der Neutralisation dampft man die milchsäurehaltige Lösung in einer Porzellanschale bis zur Trockne ab (längeres Erhitzen des eingetrockneten Rückstandes ist zu vermeiden) und nimmt wieder mit einigen Tropfen Wasser und etwa 30 ccm Alkohol auf, extrahiert mehrmals mit Alkohol, filtriert durch ein kleines Faltenfilter, wäscht mit Alkohol nach und dampft den alkoholischen Extrakt wiederum ab, ohne den Rückstand zu erhitzen. Die Milchsäure wird dann unter Zusatz von Schwefelsäure und Ammonsulfat mit Amylalkohol extrahiert (Münch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 17, S. 541). In angegebener Weise führt man die im Amylalkohol gelöste Milchsäure durch Schütteln mit Sodalösung in die letztere über. Die fünfmalige Extraktion, zuerst dreimal mit je 5 ccm und dann zweimal mit je 2 ccm 2 n Sodalösung, geschah in kleinen Scheidetrichtern (Tropftrichtern). Die Sodalösung wird durch wiederholtes Schütteln mit Petroläther von Amylalkohol befreit und dann am Wasserbad erhitzt, bis der Geruch nach Petroläther bzw. Amylalkohol verschwunden ist, und mit 30 ccm 2 n SO_4H_2 angesäuert. Die weitere Milchsäurebestimmung geschah nach der Acetaldehydmethode (*Fürth*, *Charnass*), am besten in der von *Valentin* (Münch. med. Wochenschr. 1925, Nr. 3, S. 72) beschriebenen Weise. Wichtig ist, das vorgelegte Sulfit nach vollendeter Destillation unter zeitweiligem Umschütteln 1 Stunde lang stehenzulassen, bis sich Acetaldehyd und Sulfit vereinigt haben. Vorzeitige Titration mit n/100 Jodlösung kann zu großen Fehlern Anlaß geben. Bei Einhaltung dieser Vorschrift ist eine Zugabe von Bicarbonat unnötig.

Unsere gefundenen Milchsäurewerte sind um 15 Proz. aufgewertet, weil die Analyse von milchsaurem Lithium nach dieser Methode um 15 Proz. zu niedrige Resultate gab.

Albuminateiweiß. Bei der Titration der alkalischen Bestandteile mit n/10 ClH und Methylrot als Indikator fallen die Albuminateiweißkörper in so fein verteiltem Zustande aus, daß sie kaum wahrnehmbar sind. Beim Erwärmen am Wasserbad wird ein Gerinnsel sichtbar, das, auf getrocknetem und gewogenem Filter gesammelt, mit heißem Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen wird. Nach dem Trocknen bis zur Gewichtskonstanz erhält man die Menge des im Muskel vorhandenen ionisierten Eiweißes.

H′-Konzentration. Diese wird im Kochextrakt an der Chinhydronelektrode gemessen. Zu diesem Zwecke wird eine größere Extraktmenge hergestellt. Statt 16 g werden jetzt 20 g Muskel kochend extrahiert und dann auf 400 ccm Flüssigkeit aufgefüllt; dadurch werden 80 ccm zur Bestimmung der H′-Konzentration verfügbar.

Glykogenbestimmung. 5 g Muskel werden in 10 ccm heißer 60proz. Kalilauge gelöst, 2 Stunden am Wasserbad erhitzt und das Glykogen nach dem abgekürzten Verfahren von *Bang* (*Hoppe-Seyler*, *Thierfelder*, Handb. d. physiol. u. pathol. chem. Analyse, 9. Aufl., S. 882) bestimmt.

Tabelle III.

	Glykogengehalt des Muskels sogleich nach dem Tode Proz.	Pufferungsbreite des Muskels		Säure-Alkali-Index		H'-Ionenkonzentration des Extraktes		Milchsäuregehalt Proz.		Eiweißgehalt des Extraktes		Zeit des Eintritts der Starre nach dem Tode
		weiß	rot	weiß	rot	p_H weiß	p_H rot	weiß	rot	weiß	rot	
Saure Totenstarre 24h nach dem Tode	0,2 bis 0,6	90,78	81,50	6,31	4,00	5,99 bis 6,11	6,21 bis 6,43	0,705	0,533	0,006	0,142	$^1/_2$ bis $3^1/_2$ h
Alkalische Hungertotenstarre 24h nach dem Tode	0,00 bis 0,01	94,52	90,10	0,56	0,60	7,10	7,04	0,043	0,046	1,256	1,241	2 bis 30′
Frischer glykogenreicher Muskel etwa 10′ nach dem Tode	0,2 bis 0,6	97,54	84,98	1,40	1,23	7,30	7,30	0,393	0,258	0,813	0,805	vor Eintritt der Starre

Tabelle IV.

		Muskel	
Alkaleszenz ccm n/10 Säure	Saure Starre	weiß	13,0
		rot	17,6
	Alkalische Starre	weiß	60,5
		rot	56,3
Acidität ccm n/10 Alkali	Saure Starre	weiß	77,7
		rot	63,8
	Alkalische Starre	weiß	33,9
		rot	33,7
Neutralisierte Milchsäure ccm n/10 Michsäure	Saure Starre	weiß	78,3 = 0,7052 Proz.
		rot	59,3 = 0,533 Proz.
	Alkalische Starre	weiß	4,8 = 0,043 Proz.
		rot	5,1 = 0,046 „
An Alkali gebundene Eiweißkörper in Zentigramm.	Saure Starre	weiß	0,6
		rot	14,2
	Alkalische Starre	weiß	125,6
		rot	124,1

Anmerkung: Die Angaben beziehen sich auf die Mittelzahlen gemäß Tabelle 1 und 2, 1 mm = 1 ccm n/10 Alkali oder Säure und 1 mm = 0,01 g Eiweißkörper.

Quantitative Messungen im sichtbaren und ultravioletten Absorptionsspektrum des Blutes und seiner Bestandteile[1].

Von

Rud. Suhrmann und Werner Kollath.

(Aus dem physikalisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule und dem hygienischen Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 7. März 1927.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Bei der Bestrahlung mit natürlichem und künstlichem Licht zu therapeutischen Zwecken handelt es sich letzten Endes um die Auslösung *photophysikalischer*[2]) und *photochemischer* Vorgänge, die ihren Sitz nur in verhältnismäßig geringer Tiefe haben können, da das Durchdringungsvermögen ultraroter, sichtbarer und ultravioletter Strahlen, die bei der üblichen Lichtbehandlung ausschließlich in Betracht kommen, ziemlich klein ist. Andererseits zeigen die orientierenden Versuche *v. Schuberts*[3]), daß die in die Oberfläche des Körpers eindringenden Strahlen des sichtbaren und ultravioletten Spektrums von der Haut selbst bis zur Quecksilberlinie $\lambda = 248\,\mu\mu$ verhältnismäßig *wenig*, vom Blute dagegen in sehr hohem Maße zurückgehalten werden, so daß anzunehmen ist, daß die in Frage kommenden *photochemischen Umsetzungen* ihren Sitz im *Blute* haben. Eines der Grundgesetze der

[1]) Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren in qualitativer Form (mit dem Spektrographen aufgenommene Absorptionsspektren) bereits vor einem Jahre (Januar 1926) festgelegt. Ihre quantitative Auswertung wurde jedoch durch einen schweren Unfall, den der eine von uns (*Suhrmann*) beim Experimentieren erlitt, um ein halbes Jahr verzögert. — Ein Teil der vorliegenden Messungen und Berechnungen wurde von Frl. cand. chem. *E. Weist* mit Eifer und Verständnis durchgeführt.

[2]) Z. B. Temperaturerhöhung.

[3]) Deutsch. med. Wochenschr. 1926, S. 903.



Photochemie besagt jedoch, daß der von Strahlen einer gewissen Wellenlänge ausgelöste photochemische Prozeß mit der *Absorption* dieser Strahlen aufs engste verknüpft ist: Ohne Absorption ist die Auslösung photochemischer (und ebenso auch photophysikalischer) Prozesse unmöglich. Es ist daher für die Beurteilung strahlentherapeutischer Vorgänge unbedingt erforderlich, die Stärke der Absorption ultraroter, sichtbarer und ultravioletter Lichtstrahlen im Blute zu kennen, und zwar nicht nur qualitativ, sondern vor allem *quantitativ*, da wir nur hieraus ein Bild für die Wirksamkeit bestimmter Strahlungsgebiete gewinnen können.

Die quantitative Untersuchung der Lichtabsorption im *Blute*, in den *Blutkörperchen* und im *Plasma* bildet den Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Wir beschränken uns zunächst auf den *sichtbaren* und den *ultravioletten* Teil des Spektrums, soweit er für strahlentherapeutische Zwecke in Betracht kommt, also bis zur Hg-Linie $\lambda = 230\ \mu\mu$. Die Untersuchung auch des ultraroten Gebietes bis zum Beginn der (stärkeren) Absorption durch das Wasser, also bis etwa 2,7 μ, bleibt einer späteren Untersuchung vorbehalten.

Meßmethode.

Wir benutzten bei unserer Untersuchung die Methode der direkten Bestimmung der Intensität des *einfallenden* J_0 und des *hindurchgelassenen* Lichtes J, woraus sich die Stärke der Absorption ε bzw. a nach Gleichung (1) bzw. (1a) ergibt:

$$J = J_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d} \tag{1}$$

$$J = J_0 \cdot 10^{-a \cdot d} \tag{1a}$$

(*Beersches Gesetz*), d. h. also: Wenn wir uns eine Blutlösung der Konzentration c ($c = 0{,}002$ bei einer 0,2proz. Lösung) herstellen und sie in einen Quarztrog von d cm Schichtdicke bringen, so läßt sich die Intensität J des Lichtes, welches durch den mit Lösung gefüllten Trog noch hindurchkommt, aus der Intensität J_0 des Lichtes, welches durch den mit Lösungsmittel gefüllten Trog gelangt, nach Gleichung (1) berechnen. J_0/J bzw. die für eine bestimmte Wellenlänge λ konstante Größe ε ist ein Maß für die Stärke der Absorption bei der betreffenden Wellenlänge. Zwischen beiden besteht die Beziehung:

$$\log \frac{J_0}{J} = \varepsilon \cdot c \cdot d \tag{2}$$

$$\varepsilon = \frac{1}{c \cdot d} \cdot \log \frac{J_0}{J} \tag{2a}$$

$$a = \frac{1}{d} \cdot \log \frac{J_0}{J} \tag{2b}$$

$$a = \varepsilon \cdot c \tag{3}$$

An Stelle des „*Extinktionskoeffizienten*" ε gibt man häufig auch die „*Absorptionskonstante*" a an, die gleich $\varepsilon \cdot c$ ist, also mit der Konzentration der Lösung variiert. Bei der Darstellung unserer Messungen werden wir a

und Gleichung (2b) benutzen und jedesmal c mit angeben; aus Gleichung (3) kann man dann ε leicht berechnen.

Dies setzt jedoch voraus, daß ε *eine Funktion der Wellenlänge allein* und unabhängig von der Konzentration ist, daß also das *Beersche Gesetz* Gleichung (1) gilt.

Die Gültigkeit von Gleichung (1) kann man in folgender Weise nachprüfen. Haben wir mehrere Messungen bei den Konzentrationen c_1, c_2, c_3 und bei der gleichen Wellenlänge (also auch bei gleichem ε) vorgenommen, so ist nach Gleichung (3)

$$\log a_1 = \log \varepsilon + \log c_1; \qquad \text{(I)}$$

$$\log a_2 = \log \varepsilon + \log c_2; \qquad \text{(II)}$$

$$\log a_3 = \log \varepsilon + \log c_3. \qquad \text{(III)}$$

Subtrahieren wir nun Gleichung (II) von Gleichung (I), so erhalten wir:

$$\log a_1 - \log a_2 = \log c_1 - \log c_2 \qquad \text{(IV)}$$

oder Gleichung (III) von Gleichung (I), so ergibt sich:

$$\log a_1 - \log a_3 = \log c_1 - \log c_3 \qquad \text{(IVa)}$$

In Worten: Subtrahieren wir die Logarithmen der Absorptionskonstanten voneinander, so erhalten wir die Differenz der Logarithmen der Konzentrationen, die natürlich unabhängig von der Wellenlänge ist. Tragen wir die Logarithmen der Absorptionskonstanten in Abhängigkeit von der Wellenlänge in ein Koordinatensystem ein, so müssen die für verschiedene Konzentrationen erhaltenen Kurven demnach gleichen Abstand voneinander haben, falls das *Beer*sche Gesetz gilt. Haben wir dies nachgewiesen, so können wir unsere Messungen ohne Bedenken künftig nur bei einer Konzentration vornehmen, man kann sie dann ohne weiteres auf eine andere Konzentration innerhalb des Gültigkeitsbereiches umrechnen.

Apparatur [1]).

Als Lichtquelle verwendeten wir bei unseren Versuchen eine *Quarzquecksilber-Punktlampe Q* (Abb. 1) von *W. C. Heraeus*, Hanau, die auf dem Kollimotorarm *K* eines *Quarzmonochromators* von *Schmidt* und *Haensch*, Berlin, aufmontiert war. Dicht hinter dem Austrittsrohr *A* des Monochromators befand sich ein rotierender *Sektor S*, der dazu diente, die Lichtintensität nötigenfalls auf etwa ein Zehntel herabzusetzen (die genaue Lichtschwächung durch den Sektor betrug 1/9,72); durch eine *Quarzlinse L* von 25 cm Brennweite wurde das Lichtbündel zusammengedrückt und durch den mit der Lösung gefüllten *Meßtrog* T_1

[1]) Die Apparatur war im wesentlichen die gleiche wie bei *Suhrmann* und *Huppert*. Zeitschr. f. phys. Chem. **116**, 319, 1925. Die von Herrn *v. Halban* (Zeitschr. f. phys. Chem. **122**, 337, 1926) an ihr geübte Kritik hat sich inzwischen als unberechtigt erwiesen, da Herr *v. Halban* neuerdings (nach einer brieflichen Mitteilung an *K. Scheibe*, Chem. Ber. **59**, 2616, 1926) für die Absorption des KNO_3 Werte erhält, die mit den seinerzeit von *S.* und *H.* gemessenen wesentlich besser übereinstimmen, als mit seinen eigenen früher gemessenen. Wir kommen hierauf an anderer Stelle noch zurück.



hindurch auf die lichtempfindliche Fläche einer *Rubidiumzelle Z mit Quarzfenster* konzentriert. Der Meßtrog hatte eine lichte Weite von $d = 1{,}003$ cm; er war von zwei plangeschliffenen und aufgeschmolzenen

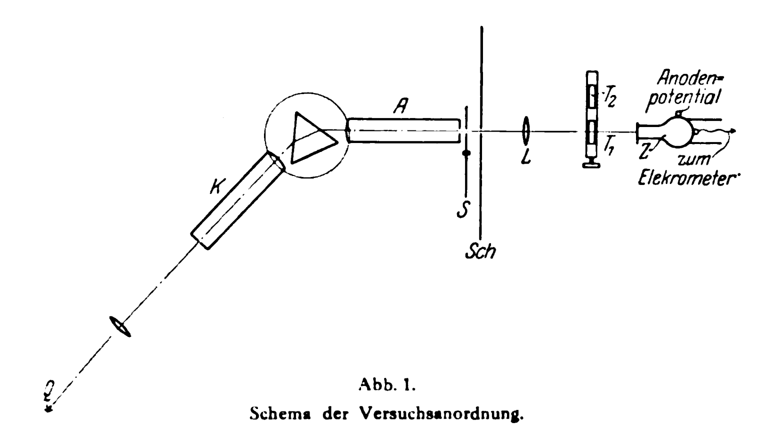


Abb. 1.
Schema der Versuchsanordnung.

Quarzplatten begrenzt, bestand also ganz aus Quarz. An seine Stelle konnte ein gleich beschaffener[1]), mit Lösungsmittel gefüllter *Vergleichs-Quarztrog* T_2 geschoben werden, der dazu diente, J_0 zu bestimmen.

Zwischen dem Sektor S und der Quarzlinse L befand sich der *Schirm Sch*, der mit einer durch einen photographischen Auslöser betätigten *Lichtklappe* versehen war. Er, sowie ein geschwärzter Kasten, der die Quecksilberlampe umgab, schützten die Meßapparatur vor falschem Licht.

Eintritts- und Austrittsspalt des Monochromators waren während sämtlicher Messungen gleich weit, und zwar 0,40 mm geöffnet. Dieser Spaltweite entsprach in der Gegend von 300 $\mu\mu$ ein Spektralbereich von 30 Å.

Die Photozelle stand in Verbindung mit einem *Fadenelektrometer*[2]), das dazu diente, den durch das Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgelösten Photostrom zu ermitteln. Da der Photostrom proportional der Lichtintensität J_0 bzw. J ist, ergibt sich für den Quotienten J_0/J das Verhältnis der jeweiligen Photoströme. Diese wurden durch Er-

[1]) Ein ganz geringer Unterschied in der optischen Beschaffenheit der Tröge wurde dadurch eliminiert, daß man in einer besonderen Meßreihe beide Tröge mit Lösungsmittel füllte und das Verhältnis der Lichtintensitäten in diesem Falle ermittelte; hieraus ergab sich eine Korrektionsgröße, die bei den endgültigen Messungen in Rechnung gestellt wurde.

[2]) Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sind wir für das freundlichst überlassene Fadenelektrometer zu Dank verpflichtet; ebenso danken wir der Firma Schmidt und Haensch für die liebenswürdige leihweise Überlassung des Monochromators.

mittlung der *Aufladezeiten* des Elektrometers mit der *Stoppuhr* festgestellt, indem man jedesmal die Zeit maß, die verstrich, während der Elektrometerfaden eine bestimmte Anzahl von Skalenteilen durchlief.

Die *Absorptionsmessungen* gingen also in folgender Weise vor sich: Man stellte die ausgeeichte Mikrometerschraube des Monochromators auf eine bestimmte Wellenlänge λ (Quecksilberlinie) ein und maß die Aufladezeit t_0 des Elektrometers, während sich der mit dem Lösungsmittel gefüllte Vergleichstrog im Strahlengang befand. Darauf schob man den mit der zu untersuchenden Lösung gefüllten Meßtrog an seine Stelle und bestimmte wiederum die Aufladezeit t. Das reziproke Verhältnis der Aufladezeiten t/t_0 ergab dann ohne weiteres das Verhältnis der Lichtintensitäten J_0/J, aus dem sich die Absorptionskonstante a nach Gleichung (2b) berechnen ließ.

Herstellung der Lösungen.

Die *ersten Blutlösungen* (Versuche 2, 3, 4) wurden in folgender Weise hergestellt. Man entnahm mittels einer paraffinierten Spritze 10 ccm Blut aus der Armvene und verdünnte sie mit destilliertem Wasser bis zu einer Konzentration von 0,5, 0,2 und 0,1 Proz.

Zu den *späteren Blutlösungen* verwendeten wir ebenfalls 10 ccm Blut der Armvene, jedoch wurde jetzt ein Teil in 4proz. *Natriumcitratlösung* im Verhältnis von 1 Teil Citratlösung und 3 Teilen Blut aufgefangen. Der andere Teil wurde defibriniert und in ihm das Volumenverhältnis von Blutkörperchen zu Plasma gleich 42 : 58 mit dem *Hämatokriten* ermittelt. Einen Teil des Citratblutes verdünnten wir nun mit redestilliertem Wasser auf 0,2 Proz. und hämolysierten ihn dadurch[1]).

Um die roten *Blutkörperchen* und das *Plasma* getrennt untersuchen zu können, wurde die konzentrierte Citratlösung bald nach der Herstellung vorsichtig zentrifugiert (1500 bis 2000 Touren), um eine Hämolyse nach Möglichkeit zu vermeiden. Darauf wurde das Plasma mittels feiner Kapillaren abgehebert und unter Berücksichtigung des Hämatokritverhältnisses und der anfänglichen 75proz. Verdünnung ebenfalls auf 0,2 Proz. ($c' = 0{,}002$) des Gesamtblutes verdünnt. Eine solche Plasmalösung besaß also in bezug auf das Vollplasma die Konzentration $c = c' \cdot \frac{58}{100} = 0{,}00116$.

[1]) Von einem Auszentrifugieren der Schatten haben wir abgesehen, da uns nicht nur an der Absorption der ausgetretenen Blutkörperchenbestandteile (Farbstoff und Eiweiß), sondern deren Gesamtverhalten lag; die Absorption der einzelnen Bestandteile bleibt späteren Untersuchungen vorbehalten.



Die nach dem Abhebern des Plasmas übriggebliebenen *Blutkörperchen* wuschen wir nun dreimal mit 0,8proz. Kochsalzlösung und verdünnten sie dann, ebenfalls unter Berücksichtigung der beim Plasma erwähnten Verhältnisse, mit redestilliertem Wasser auf 0,2 Proz.; auch hier war also $c' = 0{,}002$ und $c = c' \cdot \frac{42}{100} = 0{,}00084$.

Um bei den Absorptionsmessungen die *Absorption des Citratzusatzes* auszuschalten, verdünnten wir die 4proz. Citratlösung in gleicher Weise wie das Gesamtblut, das Plasma und die Blutkörperchen und brachten diese Lösung als Vergleichslösung in den zweiten Trog. Vorher mußten wir uns davon überzeugen, daß dies statthaft war, indem wir ihre Absorption selbst bestimmten; in diesem Falle enthielt der Vergleichstrog redestilliertes Wasser, das in dem untersuchten Spektralgebiet keine nachweisbare Absorption besitzt. Wie sich herausstellte, ist die Absorption der benutzten Citratvergleichslösung so minimal, daß ihr Einfluß auf das Resultat bei der Untersuchung der Blut- und Blutbestandteillösungen ohne weiteres vernachlässigt werden darf, wenn man hierbei die genannte Citratlösung im Vergleichstrog verwendet[1]).

Da sich an diese Arbeit fortlaufende Untersuchungen sowohl an pigmentierten wie nicht pigmentierten, an kranken und gesunden Menschen, sowie an verschiedenen Tierarten anschließen sollen, mußten wir noch feststellen, ob die immerhin ziemlich umständliche Gewinnung der Blutbestandteile aus dem Citratblut unbedingt notwendig war, oder ob die Blutkörperchenlösung aus defibriniertem Blute und das Serum von geronnenem Blute oder defibriniertem Blute zur Untersuchung genügte, d. h. die gleiche Absorption wie die aus Citratblut erhaltenen Blutkörperchen und das aus ihm gewonnene Plasma zeigten. Deshalb haben wir außer dem Plasma noch diese beiden Sera sowie die gewaschenen Blutkörperchen des defibrinierten Blutes untersucht. Es sei vorweggenommen, daß sich bei den Körperchen keine Unterschiede, bei den Seren hingegen Verschiedenheiten bemerkbar machten, auf die wir in einer folgenden Arbeit zurückkommen.

Wir betonen noch besonders, daß natürlich die gesamte Blutmenge auf einmal entnommen und verarbeitet und die Lösungen bis zur Aufnahme der Absorptionskurven unter Lichtabschluß und bei gleicher Temperatur aufgehoben wurden. Unmittelbar vor dem Einfüllen in den Absorptionstrog schüttelten wir die Blut- sowie die Blutkörperchenlösung gut durch, um das Oxyhämoglobinspektrum zu erhalten, und stellten durch eine Kontrollmessung nach Aufnahme der Meßreihe fest, daß sich die Lösungen während der Messung nicht verändert hatten.

---

[1]) Vgl. hierzu *G. Rössler*, Chem. Ber. 58, 2612, 1926.



Ferner möchten wir erwähnen, daß sämtliche Manipulationen *steril* vorzunehmen waren, wenn man Fehlresultate wegen der Eigenschaft zahlreicher Saprophyten, den Blutfarbstoff zu verändern oder die Eiweißbestandteile durch peptonisierende Fermente anzugreifen, vermeiden wollte.

Messungsergebnisse.

1. Gültigkeit des Beerschen Gesetzes.

Die einzigen quantitativen Messungen in einem größeren Bereich des Blutabsorptionsspektrums sind die von *J. Strub*[1]), der die Absorptionskonstanten im *sichtbaren* Spektrum von $\lambda = 683\ \mu\mu$ bis $\lambda = 438\ \mu\mu$ mittels eines *König-Martens*schen Spektralphotometers bestimmte. Er variierte auch die Konzentration seiner Lösungen und stellte fest, daß bei großen Konzentrationen Abweichungen vom *Beer*schen Gesetz auftraten, die sich nach kleineren Konzentrationen hin zwar verminderten, aber doch noch deutlich zu bemerken waren.

Der für die vorliegende und die späteren Arbeiten in Betracht kommende Konzentrationsbereich liegt zwischen 0,5 und 1,0 Proz.;

Tabelle I.

Wellenlänge λ in $\mu\mu$	Absorptionskonstante α für verschieden konz. Blutlösungen		
	Erste Versuchsperson		Zweite Versuchsperson
	$c_1 = 0{,}005$ Versuch Nr. 3 α_1	$c_2 = 0{,}002$ Versuch Nr. 2 α_2	$c_2 = 0{,}001$ Versuch Nr. 4 α_2
577,9	—	0,2158	0,0938
546,1	0,6510	0,2566	0,1196
496,0	—	0,1758	0,0818
435,8	1,7861	0,7003	0,3176
404,7	—	1,7616	0,7649
390,7	—	0,8501	0,4136
365,5	1,2011	0,4637	0,2292
334,1	1,3876	0,5324	0,2383
313,2	1,0169	0,4026	0,1813
302,2	1,0206	0,4226	0,1934
296,7	1,2418	0,4960	0,2366
289,3	1,7021	0,6629	0,3115
280,3	—	0,8710	0,3931
276,0	—	0,8852	0,3971
269,9	—	0,9057	0,4184
265,5	2,1152	0,8609	0,3897
257,6	—	0,7961	0,3677
254,0	1,9164	0,7751	0,3802
248,2	—	0,8146	0,4102
239,9	—	1,2476	0,5926
237,8	—	1,4866	0,6812
234,5	—	—	0,8997
230,0	—	—	0,3911

[1]) Zeitschr. f. wiss. Photogr. **24**, 97, 1926; an dieser Stelle ist auch eine Übersicht über die in Betracht kommende ältere Literatur gegeben.

Tabelle II.

Wellenlänge λ in $\mu\mu$	Differenzen der Logarithmen der Absorptionskonstanten α aus Tabelle 1	
	$\log \alpha_1 - \log \alpha_2$ für die erste Versuchsperson	$\log \alpha_1 - \log \alpha_2$ für die erste und zweite Versuchsperson
546,1	0,405	0,736
435,8	0,407	0,750
365,5	0,413	0,719
334,1	0,416	0,765
313,2	0,402	0,749
302,2	0,383	0,723
296,7	0,399	0,720
289,3	0,410	0,738
265,5	0,390	0,734
254,0	0,403	0,702
Mittelwert:	0,403	0,734

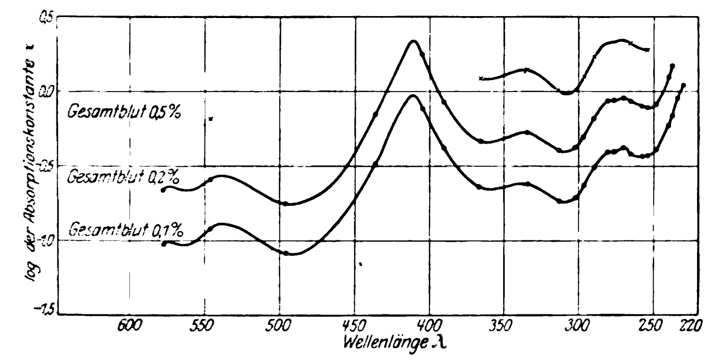


Abb. 2. Gültigkeit des *Beer*schen Gesetzes.

innerhalb dieses Bereiches mußte die Gültigkeit des *Beer*schen Gesetzes untersucht werden.

Zu diesem Zwecke stellten wir uns Blutlösungen von 0,5, 0,2 und 0,1 Proz. her und ermittelten bei jeder Lösung J_0/J für die einzelnen Linien des Quecksilberspektrums von $\lambda = 577{,}9$ bis $\lambda = 230{,}0\ \mu\mu$. Aus diesen Werten berechneten wir die Absorptionskonstante α (Tabelle I), deren Logarithmen, voneinander subtrahiert, nach Gleichung (IV) und (IVa) gleich den *Differenzen der Logarithmen der Konzentrationen* sein sollten, unabhängig also von der Wellenlänge.

Aus Tabelle II und Abb. 2 ersieht man, daß dies in der Tat der Fall ist; die Kurven, welche als Abszisse die Wellenlänge λ, als Ordinate $\log \alpha$ aufweisen, haben gleichen Abstand voneinander. Die Differenzen $\log \alpha_1 - \log \alpha_2$ (α_1 und α_2 aus Tabelle I) betragen im Mittel, wie Tabelle II zeigt, 0,403 und 0,734, während man für $\log c_1 - \log c_2 = \log 0{,}005 - \log 0{,}002 = 0{,}40$ bzw. $\log c_1 - \log c_2 = \log 0{,}005 -$

log 0,001 = 0,70 erhält, wobei noch zu berücksichtigen ist, daß das Blut der Lösung $c_2 = 0{,}001$ einer zweiten Versuchsperson entnommen wurde.

Das *Beer*sche Gesetz besitzt also für Blutlösungen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,5 Proz. im sichtbaren und ultravioletten Teile des Spektrums volle *Gültigkeit*[1]).

2. Absorptionsspektrum des Gesamtblutes.

Um festzustellen, ob sich das Absorptionsspektrum des Blutes für dieselbe gesunde Person innerhalb mehrerer Wochen erheblich verändern kann, nahmen wir nach 8 Wochen eine weitere Blutkurve auf, die in Abb. 3 eingetragen ist. Der in der Abbildung gestrichelt gezeichnete Kurventeil ist der Arbeit von *Strub* entnommen[2]). Man erkennt, daß sich unsere Meßpunkte[3]) den Werten von *Strub* gut einfügen, und ersieht ferner aus der Kurve, daß die eigentliche Absorption des Blutes erst im *violetten* Teile des Spektrums liegt und sich von dort aus über das gesamte *Ultraviolett* erstreckt. Die *Maxima der Absorptionskurven* liegen bei 575, 542 etwa 408, 338, 280, 270 $\mu\mu$; von 248 $\mu\mu$ an steigt die Kurve äußerst steil an.

In Tabelle III, Spalte 6, sind die der Kurve entsprechenden Werte der Absorptionskonstanten a [vgl. Gleichung (2b)] eingetragen. Sie

---

[1]) In einer kürzlich erschienenen Arbeit (diese Zeitschr. **179**, 348, 1926) hat *Vilma Zilzer* die Gültigkeit des *Beer*schen Gesetzes am Oxyhämoglobin bei einer Wellenlänge ($\lambda = 537{,}4\ \mu\mu$) untersucht. Sie glaubt größere Abweichungen vom *Beer*schen Gesetz feststellen zu können, da einige ihrer Messungen bei gleicher Konzentration und verschiedener Schichtdicke, sowie bei gleicher Schichtdicke und verschiedener Konzentration Werte für ε ergaben, die um mehrere Prozente voneinander abweichen. Man kann jedoch aus Tabelle III, S. 353 ihrer Arbeit ebenso eine Anzahl von Wertepaaren zusammenstellen, welche bei gleicher Konzentration und verschiedener Schichtdicke bzw. bei gleicher Schichtdicke und geänderter Konzentration sehr gute Übereinstimmung des sogenannten spezifischen Extinktionskoeffizienten aufweisen. Die bei den Messungen von Frl. *Zilzer* auftretenden wenigen größeren Abweichungen (etwa 20 bis 30 Proz.) dürften also wohl zum Teil durch im Wesen der Apparatur liegende Meßfehler und nur teilweise durch Abweichungen vom *Beer*schen Gesetz bedingt sein. Daß sich bei großen Konzentrationsunterschieden Abweichungen um einige Prozente bei größeren Wellenlängen bemerkbar machen, ist bei der Größe der in Betracht kommenden Moleküle durchaus verständlich und wurde bereits von *Strub* (l. c.) nachgewiesen. Für den Konzentrationsbereich von 0,5 bis 0,1 Proz., den wir bei unseren Messungen verwandten, kommen sie (insbesondere bei kurzwelligem Licht) jedoch, wie unsere Ergebnisse zeigen, nicht in Betracht.

[2]) Die Werte von *Strub* sind auf gleiche Konzentration wie die unsrigen reduziert.

[3]) In der Abbildung durch Kreuze bezeichnet.



unterscheiden sich nur unwesentlich von den bei den ersten Messungen erhaltenen α-Werten; die geringen Unterschiede sind vermutlich durch eine geringe Änderung der Blutkörperchenzahl bedingt.

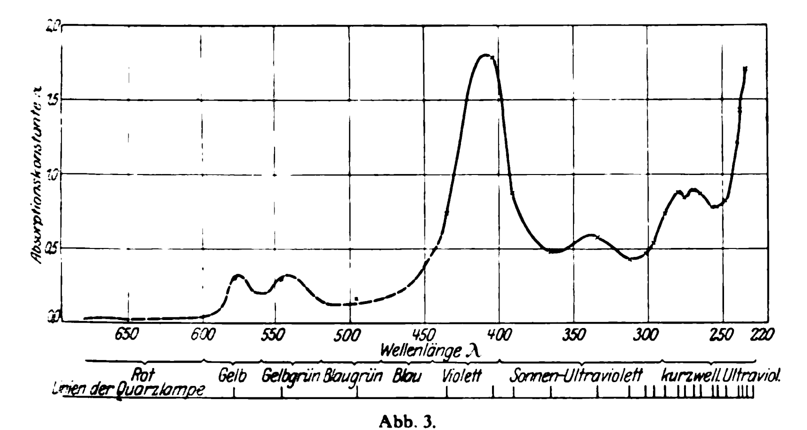


Abb. 3.

Absorption des Menschenblutes. $c = 0{,}002$ (c = Konzentration).

Tabelle III.

Wellenlänge λ in $\mu\mu$	Absorptionskonstante α bei $c' = 0{,}002$ (bezogen auf Gesamtblut) für				
	Blutkörperchenlösung, c' ungefähr 0,002 Versuch Nr. 35	Blutkörperchenlösung, umgerechnet auf $c' = 0{,}002$ Faktor: 1.308	Plasmalösung Versuch Nr. 30	Gesamtblutlösung berechnet	Gesamtblutlösung gemessen Versuch Nr. 42
579,9	0,2246	0,294	0,005	0,259	0,299
546,1	0,2057	0,269	0,0281	0,297	0,2957
496,0	0,0997	0,130	0,0498	0,180	0,1638
435,8	0,5260	0,688	0,0491	0,737	0,7429
404,7	1,3265	1,735	0,0510	1,786	1,7820
390,7	0,6377	0,834	0,0260	0,860	0,8738
365,5	0,3526	0,461	0,0248	0,486	0,4813
334,1	0,3950	0,517	0,0567	0,574	0,5769
313,2	0,2880	0,377	0,0605	0,438	0,4317
302,2	0,2979	0,390	0,0924	0,482	0,4738
296,7	0,3393	0,444	0,1028	0,547	0,5311
289,3	0,4688	0,613	0,1186	0,732	0,7318
280,3	0,5562	0,728	0,1608	0,889	0,8860
276,0	0,5613	0,734	0,1198	0,854	0,8475
269,9	0,5823	0,762	0,1143	0,876	0,8916
265,5	0,5657	0,740	0,1244	0,864	0,8678
257,6	0,5193	0,679	0,1263	0,805	0,7773
254,0	0,4872	0,637	0,1407	0,778	0,7803
248,2	0,5196	0,680	0,1476	0,828	0,8217
239,9	0,7522	0,984	0,2070	1,191	1,2133
237,8	0,8900	1,164	0,3044	1,468	1,4348
234,5	1,121	1,466	0,3573	1,823	1,703
230,0	1,987	2,599	0,6057	3,205	—

3. Absorptionsspektren der Blutkörperchen, des Plasmas und des Gesamtblutes.

Tabelle III enthält außer den Absorptionskoeffizienten a für das *Gesamtblut* noch die Koeffizienten für die *Blutkörperchen-* und die *Plasmalösung* in den Verdünnungen (c'), wie sie im Blute enthalten sind. Die Konzentration der Blutkörperchenlösung konnte allerdings aus naheliegenden Gründen nicht ganz genau getroffen werden. Dies störte jedoch nicht, da man sie in folgender Weise auf die Konzentration im Gesamtblut *umzurechnen* vermag. Bei richtiger Konzentration ist die Absorptionskonstante a_b des Gesamtblutes gleich der Summe der Absorptionskonstanten von Blutkörperchen (a_k) und Plasma (a_p), also

$$a_b = a_k + a_p.$$

Daher ist

$$a_k = a_b - a_p.$$

Wir können also zunächst angenähert a_k für einige wenige Hg-Linien aus a_b und a_p berechnen und die Quotienten $\frac{a_k \text{ berechnet}}{a_k \text{ gemessen}}$ bilden; da dieser Quotient nach Gleichung (3) gleich $\frac{\varepsilon_k \cdot c'}{\varepsilon_k \cdot c''}$ (c'' die ungenaue Konzentration) ist, ergibt sich aus ihm der Reduktionsfaktor c'/c'', mit dem die gemessenen Werte a_k zu multiplizieren sind, um sie auf die richtige Konzentration c' zu reduzieren (Spalte 3 der Tabelle III). Addiert man nun die auf die Konzentration $c' = 0{,}002$ reduzierten Werte a_k der Blutkörperchen und die Werte a_p des Plasmas, so erhält man die Werte a_b, berechnet, der Spalte 5 in Tabelle III. Wie man sieht, ist die Übereinstimmung zwischen diesen berechneten Werten und den beobachteten (Spalte 6) Werten a_b des Gesamtblutes recht befriedigend. Man ersieht hieraus, daß sich die Absorption des Gesamtblutes *additiv* aus der Absorption der Einzelbestandteile zusammensetzt[1]).

Abb. 4 zeigt die Absorptionskurven des *Gesamtblutes*, der *Körperchen* und des *Plasmas*; die des letzteren ist gegenüber der Blutkörperchenabsorption fast verschwindend *klein*, erst von $\lambda = 300\,\mu\mu$ an beginnt ein merklicher Anstieg und verursacht das im Gesamtblut bei $280\,\mu\mu$ auftretende kleine Maximum. Von $\lambda = 245\,\mu\mu$ an wächst auch die Plasmaabsorption ebenso wie die der Körperchen sehr stark, bis sie

[1]) Diese Feststellung ist unabhängig davon, ob für das *Plasma* das *Beer*sche Gesetz gilt. Wenn wir auch nachgewiesen haben, daß dieses Gesetz für das Gesamtblut im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 0,1 Proz. Gültigkeit besitzt, so wären Abweichungen hiervon für das Plasma auch innerhalb dieses Bereiches möglich, da die Absorption des Blutfarbstoffs im Gesamtblut die des Plasmas weit überwiegt. Wir werden deshalb demnächst auch die Gültigkeit des *Beer*schen Gesetzes für Plasma und Serum untersuchen, um festzustellen, ob hier größere Abweichungen vorhanden sind.

schließlich bei etwa 230 $\mu\mu$ praktisch unendlich groß wird. In der Absorptionskurve des Plasmas in Abb. 4 sind die durch Differenzbildung aus Gesamtblut- und Blutkörperchenabsorption erhaltenen Werte als Kreise eingetragen. Sie fallen mit der gemessenen Kurve gut zusammen.

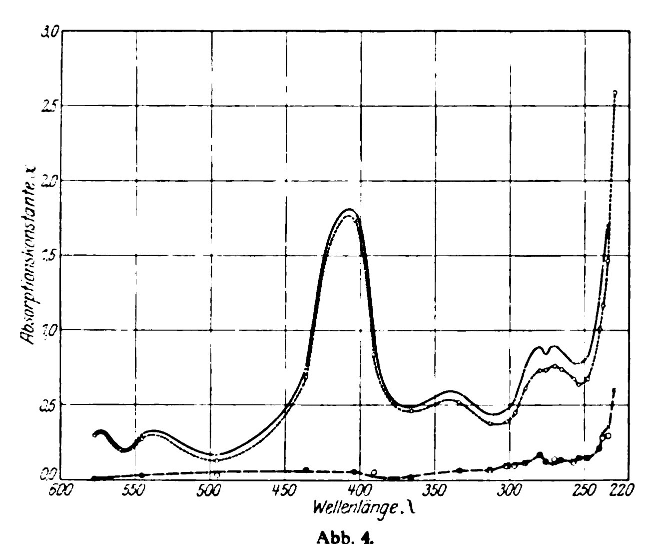


Abb. 4.

Additivität der Absorption des Plasmas und der Blutkörperchen zur Absorption des Gesamtblutes.

•————————• Citratblut $c = 0{,}002$.

∘ ∘ ∘ ∘ ∘ ∘ ∘ ∘ ∘ ∘ gewaschene Blutkörperchen c'*) $= 0{,}002$.

×– –×– –×– –× Citratplasma c'*) $= 0{,}002$.

• • • • Citratplasma, berechnete Werte.

*) c' = Konzentration unter Berücksichtigung des Volumverhältnisses von Blutkörperchen im Plasma.

Deutung der Versuchsergebnisse.

Auf die wichtigen Schlüsse, die sich in bezug auf die Physiologie des Blutes und somit auf die Handhabung der Strahlentherapie aus den Versuchsresultaten ergeben, wollen wir in einer folgenden Arbeit näher eingehen. An dieser Stelle sei nur einiges über die Art der *Auswertung* der erhaltenen Zahlen gesagt.

Bekanntlich befinden sich in der tierischen Haut feine *Kapillaren*, durch welche sich die Blutkörperchen einzeln mit Plasmazwischenräumen oder in Reihen[1]) hindurchschieben[2]). Da die Körperchen alle Lagen einnehmen können, dürfen wir mit einem mittleren Durchmesser der in einer Kapillare dem Lichte entgegentretenden Blutkörperchen

---

[1]) Die (grob gesprochen) linsenförmigen Blutkörperchen mit der Breitseite aneinander gereiht.

[2]) Vgl. z. B. *B. Ebbecke*, Physiologie der Kapillaren. Naturwissensch. 14, 1132, 1926.

Tabelle IV.

Wellenlänge λ in $\mu\mu$	Absorption in Proz. des einfallenden Lichtes: Blutkörperchenschicht von 7,8 μ Dicke	Plasmaschicht von 7,8 μ Dicke	Wellenlänge λ in $\mu\mu$	Absorption in Proz. des einfallenden Lichtes: Blutkörperchenschicht von 7,8 μ Dicke	Plasmaschicht von 7,8 μ Dicke
683,0	5	—	296,7	61	15
575,4	50	—	289,3	73	17
546,1	44	4	280,3	79	22
541,7	50	—	276,0	79	17
505,5	23	—	269,9	80	16
496,0	24	7	265,5	80	17
435,8	77	7	257,6	77	18
404,7	97	7	254,0	74	18
390,7	83	4	248,2	77	20
365,5	63	4	239,9	88	27
334,1	77	8	237,8	92	38
313,2	55	9	234,5	96	42
302,2	57	13	230,0	100	61

von 7,8 μ rechnen. Aus unseren α-Werten können wir nun angenähert berechnen, wieviel Prozent des auffallenden Lichtes verschiedener Wellenlänge eine solche Schicht absorbiert[1]). Tabelle IV enthält die

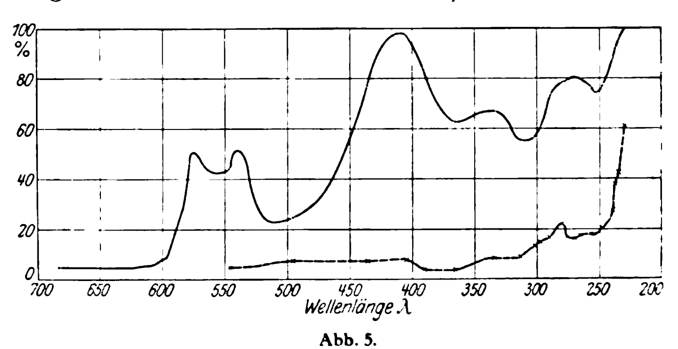


Abb. 5.

•———————• Absorption einer Blutkörperchenschicht von 7,8 μ,
×- - - - - -× „ „ Plasmaschicht „ 7,8 μ
(in Proz. des einfallenden Lichtes).

erhaltenen Zahlen, die in Abb. 5 nochmals dargestellt sind. Man erkennt, daß eine einzelne, von Blutkörperchen erfüllte Kapillare an der Grenze des Sonnenultravioletts bei $\lambda = 290\ \mu\mu$ 73 Proz. und bei $\lambda = 405\ \mu\mu$ (violett) 97 Proz. absorbiert, während sie im Roten bei

[1]) Diese wie die folgenden Berechnungen ergeben natürlich nur angenäherte Werte, da sie unter der Annahme einer Gültigkeit des *Beer*schen Gesetzes von der Konzentration $c = 0{,}002$ bis zu $c = 1$ durchgeführt sind; sie lassen jedoch die Größe der fraglichen Vorgänge bereits in guter Annäherung erkennen, da die Abweichungen vom *Beer*schen Gesetz auch innerhalb großer Konzentrationsbereiche nur einige Prozente betragen.

Tabelle V.

Wellenlänge λ in $\mu\mu$	„Eindringungstiefe" δ des Lichtes in das Blut in mm	Wellenlänge λ in $\mu\mu$	„Eindringungstiefe" δ des Lichtes in das Blut in mm
683,0	1,7	296,7	0,075
575,4	0,12	289,3	0,062
546,1	0,13	280,3	0,045
541,7	0,12	276,0	0,047
505,5	0,33	269,9	0,045
496,0	0,24	265,5	0,046
435,8	0,054	257,6	0,051
404,7	0,022	254,0	0,051
390,7	0,045	248,2	0,049
365,5	0,083	239,9	0,033
334,1	0,069	237,8	0,028
313,2	0,092	234,5	0,023
302,2	0,084	230,0	—

$\lambda = 680\ \mu\mu$ nur 5 Proz. wegnimmt. Trifft das Licht hingegen auf Plasma auf, so werden bei $\lambda = 578\ \mu\mu$ nur 0,8 Proz., bei $\lambda = 450\ \mu\mu$ 7 Proz., bei 300 $\mu\mu$ 13 Proz. zurückgehalten. Kräftig tritt jetzt das Absorptionsmaximum des Plasmas bei $\lambda = 280\ \mu\mu$ (22 Proz.) hervor.

Noch deutlicher wird dies, wenn wir eine Art „*Eindringungstiefe*" δ in der Weise definieren, daß wir darunter die Schichtdicke des Blutes verstehen, in der 99 Proz. des eindringenden Lichtes absorbiert werden. Tabelle V gibt die Eindringungstiefe δ in Millimetern in Abhängigkeit von der Wellenlänge an, Abb. 6 enthält die zugehörige Kurve, δ beträgt bei *290 $\mu\mu$ 0,06 mm, bei 405 $\mu\mu$ 0,05 mm* und *bei 680 $\mu\mu$ 1,7 mm.*

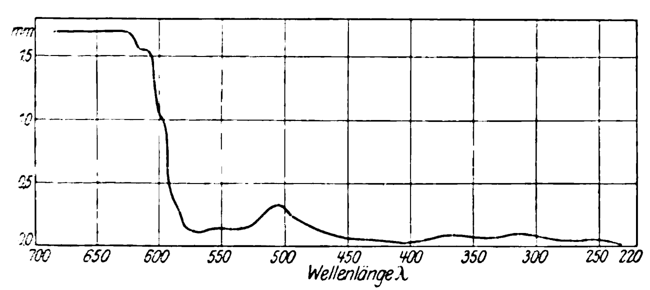


Abb. 6. Eindringungstiefe des Lichtes in das Blut in mm.

Aus den oben erwähnten Versuchen *v. Schuberts* geht hervor, daß die Strahlen des sichtbaren und ultravioletten Spektrums das Blut erreichen; Abb. 5 und 6 ergeben andererseits deutlich, *daß der Lichtabsorptionsprozeß im Blute und damit auch die durch ihn bedingten physiologischen bzw. photochemischen Umwandlungen offenbar in ganz geringer Tiefe der Haut vor sich gehen müssen*, sofern es sich *um sichtbare* oder *ultraviolette* Strahlung handelt. Man wird daher eine erhöhte

strahlentherapeutische Wirkung auf den *Körper* erzielen, wenn man während der Strahlenbehandlung für eine gute *Durchblutung* der Haut sorgt; hierdurch wird zugleich der *photochemische Umsatz vergrößert*, da in der Zeiteinheit eine größere Anzahl von Blutkörperchen bzw. eine größere Menge Plasma der heilenden Strahlung ausgesetzt sind[1]).

Zusammenfassung.

1. Es wird die Gültigkeit des *Beerschen Gesetzes* im *sichtbaren* und *ultravioletten Absorptionsspektrum* bei *Blutlösungen* in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,5 Proz. untersucht und bestätigt.

2. Die quantitative Ermittlung der spektralen *Blutabsorptionskurve*, der Absorptionskurven der *Blutkörperchen* und der des *Plasmas* von 578 bis 230 $\mu\mu$ ergibt, daß sich die Absorption der Blutbestandteile *additiv* zur Absorption des Gesamtblutes zusammensetzt.

3. Aus den erhaltenen Werten der *Absorptionskonstanten* wird mit guter Annäherung berechnet, wieviel Prozent der auffallenden Strahlung im sichtbaren und ultravioletten Spektrum von einer 7,8 μ (mittlerer Durchmesser der Blutkörperchen) dicken Blutkörperchenschicht absorbiert werden; ferner wie groß die „*Eindringungstiefe*“ der Strahlen verschiedener Wellenlänge in das Blut ist, wenn man unter „Eindringungstiefe“ diejenige Blutschicht versteht, die 99 Proz. der einfallenden Strahlung absorbiert.

---

[1]) Will man dagegen eine *lokale Lichtwirkung* erzielen, so ist die Blutleere durch Druck das Gegebene, eine Methode, wie sie ja auch bei der Lupusbestrahlung geübt wird.

Beiträge zur Kenntnis der Gallensekretion. IV.

Von

Ernst Neubauer.

(Aus der I. medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 8. März 1927.)

In der kleinen Gruppe der choleretisch wirkenden Gallensäuren steigt sowohl bei Wasserstoff- wie auch bei Sauerstoffabspaltung die gallensekretionsfördernde Kraft, so daß die Wirkungsgröße von der Cholsäure zur Dehydrocholsäure, von der Desoxycholsäure zur Desoxydehydrocholsäure, ferner auch von der Cholsäure zur Desoxycholsäure zunimmt. Dabei steigert die Reduktion die Giftigkeit dieser Körper, die Dehydrierung setzt sie herab, so daß in der Dehydrocholsäure ein Optimum therapeutischer Verwendbarkeit gefunden werden konnte[1]). Hatten frühere Beobachtungen gezeigt, daß die Abspaltung eines Atoms Sauerstoff aus einer Hydroxylgruppe der Cholsäure (= Trioxycholansäure) in der Desoxycholsäure (= Dioxycholansäure) die choleretische Wirkung steigert, daß ferner die nicht hydroxylierte Cholansäure in dieser Hinsicht wirkungslos ist[1]), so sollte nun auch noch die Monoxycholansäure in die Untersuchung einbezogen werden, eine von *H. Fischer*[2]) als Lithocholsäure in Rindergallensteinen gefundene, von *H. Wieland* und *P. Weyland*[3]) aus normaler Rindergalle dargestellte und in ihrer Konstitution weitgehend aufgeklärte, zwischen einer choleretisch höchst wirksamen und einer unwirksamen stehende Gallensäure. Von dieser in reinem Zustand schwer zugänglichen Substanz standen mir durch das mich zu großem Danke verpflichtende Entgegenkommen Herrn Professor *Wielands* 57 mg zur Verfügung; sie wurde an Kaninchen in der früher beschriebenen Versuchsanordnung erprobt. Da nach *Wieland* das Natriumsalz der Lithocholsäure in Wasser schwer löslich ist, wurde nach seiner Angabe die Säure zunächst

---

[1]) *Ernst Neubauer*, diese Zeitschr. **130**, 556, 1922; **146**, 481, 1924; Klin. Wochenschr. **2**, 1065, 1923.

[2]) Zeitschr. f. phys. Chem. **73**, 204, 1911.

[3]) Ebendaselbst **110**, 123, 1920.

in heißem Alkohol gelöst und zu der warmen Lösung die berechnete Menge NaOH n/20-Lösung zugesetzt; ebenso wurde mit äquimolekularen Mengen von Cholsäure bzw. Desoxycholsäure vorgegangen, die zum Vergleich und zur Kontrolle herangezogen wurden.

Versuch 48.

Männliches Kaninchen, 2400 g. Urethannarkose, Jugularvenenkanüle, Choledochusfistel bei abgeklemmtem Ductus cysticus.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spez. Gewicht	Bemerkungen
4h bis 4h15′	1,9			
4 15′ „ 4 30	1,5	618,0	1012,1	
4 30 „ 4 45	1,3			
4 45 „ 5	1,2			
5 „ 5 15	1,1	618,2	1012,4	
5 15 „ 5 30	2,4	638,3	1012,0	Um 5h15′ werden 0,0575 g Cholsäure als Natriumsalz intravenös injiziert
5 30 „ 5 45	1,1			
5 45 „ 6	1,1	667,1	1013,3	
6 „ 6 15	1,0*)	659,7	1013,3	Um 6h werden 0,0530 g Lithocholsäure als Natriumsalz intravenös injiziert

In diesem Versuch, in dem die Cholsäure ihre typische Wirkung zeigt, ist die Lithocholsäure wirkungslos geblieben. Da aber das Tier 16 Minuten nach der Einspritzung der Lithocholsäure einging, war die entfernte Möglichkeit vorhanden, daß diese Substanz in der angewandten Gabengröße den Gesamtorganismus oder die Leber so geschädigt hätte, daß ihr etwaiger fördernder Einfluß nicht in Erscheinung treten konnte. Doch gelang es, mit dem geringen noch verfügbaren Rest der Substanz den erhobenen Befund zu bestätigen. Frühere Erfahrungen hatten gelehrt, daß schon Dosen von wenig mehr als 1 mg Desoxycholsäure auf je 1 kg Körpergewicht zweifelsfrei eine choleretische Wirkung erkennen lassen, vorausgesetzt, daß ein Tier in Beobachtung stand, dessen Gallensekretion von besonders konstanter Größe war. Man hat dabei die Gallentropfen in kleinen Zeiträumen (Minuten) zu zählen, da die Wirkung so kleiner Mengen choleretischer Substanz bei Messung der in größeren Zeiträumen (5 oder 15 Minuten) gelieferten Galle verdeckt wird. Es wurde also in einem weiteren Versuch die in Minuten fallenden Gallentropfen gezählt und, als sich die Gallentropfenzahl als völlig konstant erwiesen hatte, zunächst Lithocholsäure, später in äquimolekularer Menge Desoxycholsäure intravenös injiziert. Zur Lösung der geringen Substanzmengen war nicht mehr als 0,1 ccm Alkohol erforderlich, während im vorangehenden Versuch je 0,5 ccm verwendet wurden; doch ist

auch diese beim Erwärmen noch geringer gewordene Menge so klein, daß sie nicht als choleresehemmend in Betracht zu ziehen ist[1]).

Versuch 49.

Männliches Kaninchen, 2400 g, Urethannarkose, Jugularvenenkanüle, Choledochusfistel bei abgeklemmtem Ductus cysticus.

Zahl der in je 1 Minute abfließenden Tropfen Galle:

3,6 mg Lithocholsäure als Natriumsalz
↓
4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4,
4, 5, 4, 4, 4, 4, 4, 3, 4, 5, 7, 7, 5, 5, 4, 5, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4,
4, 4, 4, 4
↑
3,75 mg Desoxycholsäure als Natriumsalz

Die Lithocholsäure hat sich also als choleretisch unwirksam erwiesen. Von den vier Gliedern der Reihe Trioxy-, Dioxy-, Monoxycholansäure und Cholansäure steigern nur die beiden ersten, und zwar die zweite (Desoxycholsäure) mehr als die erste (Cholsäure) die Gallensekretion, die beiden letzten nicht. Von allen untersuchten Gallensäuren konnten bis nun nur Monocarbonsäuren mit zwei oder drei OH- oder CO-Gruppen als choleretisch wirkend festgestellt werden.

---

[1]) *J. Pohl*, Zeitschr. f. exper. Med. **80**, 423, 1922; *E. Stransky*, diese Zeitschr. **155**, 256, 1925.

Eine neue gebrauchsfertige Apparatur zur elektrochemischen Messung der Wasserstoffionenkonzentration.

Von

F. Emslander (Regensburg).

(Eingegangen am 9. März 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Unter obigem Titel bringt Herr Professor Dr. *H. Lüers* in **171,** 119, 1926 dieser Zeitschr. Ausführungen, die eine Richtigstellung erfordern. *H. Lüers* schreibt: „Bisher mußte die Apparatur zu Potential-

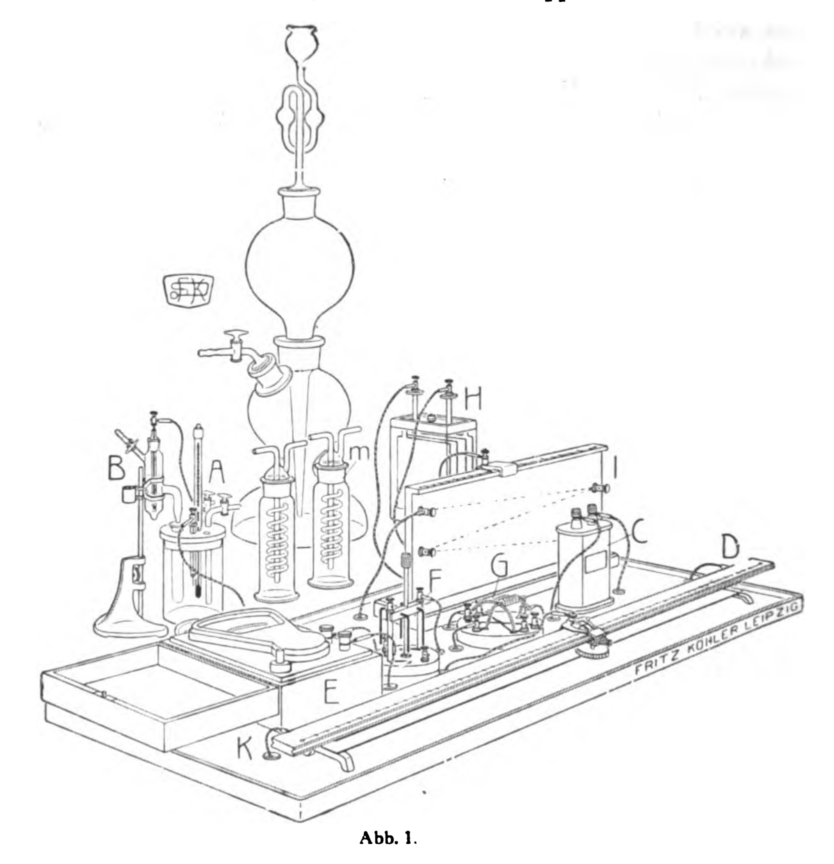


Abb. 1.

messungen jeweils aus einzelnen Teilen zusammengesetzt werden, was mancherlei Nachteile im Gefolge hatte. Der damit verknüpfte Zeitaufwand, ferner zahlreiche Anfragen von Fachkollegen oder Interessenten nach solchen Apparaten waren die Veranlassung, daß wir einen vollständig gebrauchsfertigen Apparat zu konstruieren versuchten. Der Vorteil einer

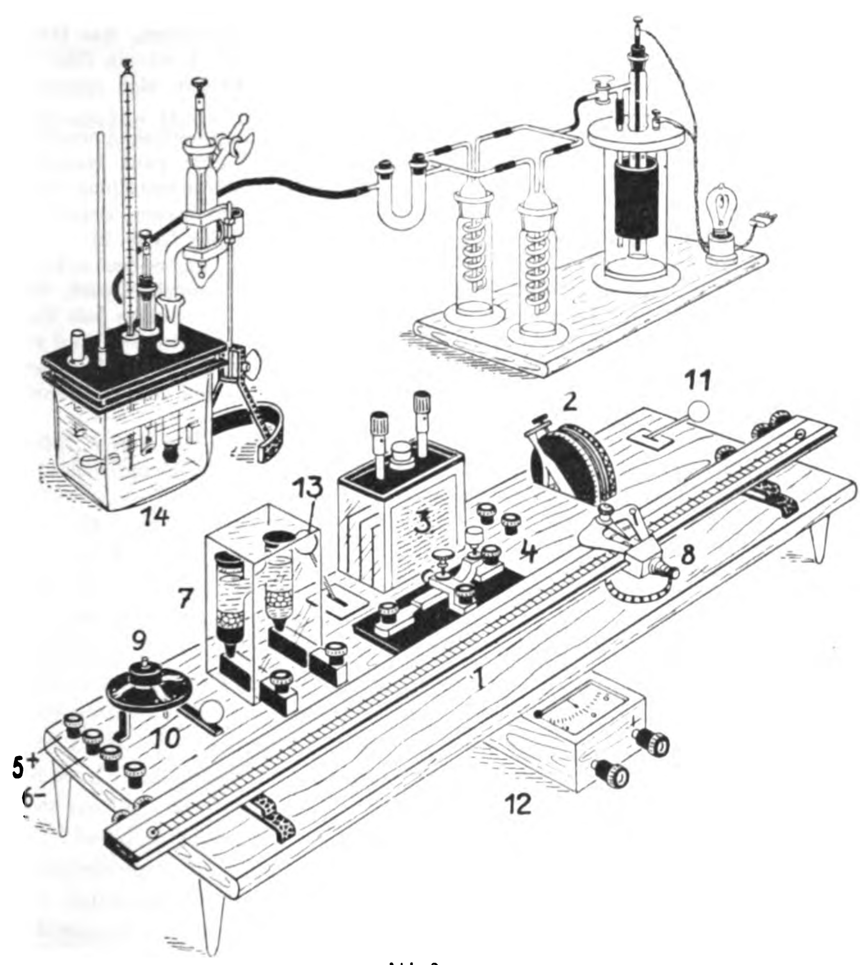


Abb. 2.

stets gebrauchsfertigen Apparatur und die schnelle, einfache Handhabung verkürzen die zur Messung notwendige Zeit sehr erheblich, so daß die Bestimmung der (H˙) nun auch in solchen Fällen erfolgen kann, wo man sich bisher mit anderen, weniger genauen Untersuchungsmethoden begnügte".

F. Emslander[1]) hat bereits im Jahre 1913 die Messung der Wasserstoffionenkonzentration in die Cymotechnik eingeführt. Damals schon

[1]) *F. Emslander*, Kolloid-Zeitschr. **18**, 156, 1913.

hat sich aus den gleichen Gründen, die *H. Lüers* jetzt ebenfalls angibt, das Bedürfnis nach einer handlichen Apparatur herausgestellt. Wir konstruierten deshalb mit Hilfe der bekannten Firma *Fritz Köhler*, Universitätsmechaniker in Leipzig, eine der heutigen *Lüers*schen Ausführung gleichwertige Meßapparatur. Dieselbe kam 1914 in den Handel, wurde in verschiedenen Betrieben und Instituten eingeführt, unter anderen im Jahre 1915 an der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München, was Herrn Professor Dr. *Lüers* damals schon bekannt war. Abb. 1 ist ein Bild der Apparatur aus jener Zeit, wodurch weitere Ausführungen sich erübrigen dürften.

Seit jener Zeit hat das Interesse an derartigen Meßmethoden erheblich zugenommen, weshalb wir es unternommen haben, eine ganz besonders einfache und dadurch auch sehr billige Apparatenzusammenstellung durch die bereits erwähnte Firma *Fritz Köhler* ausführen zu lassen, deren Abbildung ebenfalls weitere Ausführungen ersparen dürfte (Abb. 2).

Es sei nur erwähnt, daß die kompendiöse Ausführung neben anderem dadurch erreicht wurde, daß der Meßdraht zur Hälfte umgelegt wird. Der Meßdraht hat eine Länge von 1018,7 mm, gestattet also ohne jede Umrechnung das Ablesen von Millivolt. Je nach den Bedürfnissen wird der Meßdraht einmal für einen Meßbereich von 0 bis 600 Millivolt (besonders auch für die Chinhydronmethode) oder aber von 400 bis 1018,7 Millivolt zur Ausführung gebracht.

Zweck dieser Darlegungen ist eine Richtigstellung der von *H. Lüers* gemachten Ausführungen, womit ich die Priorität der in Frage stehenden Apparatur für meine Person reklamiere.

Vorläufige Versuche über die allgemeine Bedeutung der Kohlensäure für die Pflanzenzelle (Versuche an Aspergillus niger).

Von

August Rippel und Hermann Bortels.

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 10. März 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Gelegentlich der Bearbeitung anderer Fragen haben wir einige Versuche darüber angestellt, ob völliger Abschluß der Kohlensäure der Luft auf *Aspergillus niger* von irgend einem erkennbaren Einfluß ist. Wir kamen dabei zu dem gewiß etwas überraschenden Ergebnis, daß deren Gegenwart für den Pilz förderlich (wenn nicht notwendig) ist. Da jedoch ein völliger Ausschluß der Kohlensäure bei einem erwachsenen Pilzmycel infolge der kräftigen Kohlensäurebildung nicht möglich ist, so sollen unsere Versuche zunächst nur die Wirkung der Kohlensäure auf das allererste Wachstum, das Keimungsstadium, zeigen. Ob die von uns beobachtete Erscheinung auch auf den gesamten Lebensablauf übertragen werden kann, soll weiter unten noch kurz erörtert werden.

Über den Einfluß der Kohlensäure ist, wenn wir von der selbstverständlichen und hier nicht zu berücksichtigenden Bedeutung für die Autotrophen absehen, bereits eine Anzahl von Arbeiten erschienen, die sich teils mit dem hemmenden Einfluß höherer Konzentrationen, teils mit der „stimulierenden“ Wirkung geringerer (aber über den Gehalt normaler Luft daran hinausgehender) Konzentrationen beschäftigen. Beide Fragen spielten bei unseren Versuchen keine Rolle; wir versuchten vielmehr, den Einfluß eines *völligen* Fehlens der Kohlensäure festzustellen, während man eben bisher, soweit uns bekannt ist, nicht unter den normalen Kohlensäuregehalt der Luft herunterging.

Die erste Beobachtung, von der wir ausgingen, war die, daß *Aspergillus niger*, mit dem wir alle Versuche anstellten, bei Impfung mit Sporen, auf einer Nährlösung, durch die CO_2-freie Luft hindurch-

gesaugt wurde, nicht recht wachsen wollte: die Sporen keimten abnorm spät, und der Pilz entwickelte sich weiter sehr schlecht. Wurde die zur CO_2-Absorption verwendete Apparatur entfernt und ein gewöhnlicher Wattepfropfen aufgesetzt, so kam das Wachstum normal und schnell in Gang. Es schien sich ferner der Pilz in einer nicht sterilisierten Lösung, beim Durchsaugen CO_2-freier Luft normal zu entwickeln, was unschwer durch das Austreiben der Kohlensäure aus der (sauren) Nährlösung während des Sterilisierens erklärt werden konnte. Wir untersuchten die auffallende Erscheinung nunmehr etwas näher.

1. Versuchsanordnung. Zwei völlig gleiche 1-Liter-Erlenmeyerkolben waren, nebeneinander gekoppelt, an die Saugpumpe angeschlossen. Ein langsamer Luftstrom, durch Glashahn zwischen Kolben und Pumpe reguliert, strich zunächst durch drei dreiteilige Kugelapparate, die bei dem einen Kolben mit 40proz. Kalilauge, bei dem anderen mit destilliertem Wasser gefüllt waren. Dann gelangte er durch ein langes Rohr bis dicht über die Nährlösung und wurde oben im Kolben durch ein kurzes Rohr wieder abgesaugt. In beiden Kolben war der Luftstrom durch Quetschhähne zu gleicher Stärke reguliert. Außerdem hing in jedem Kolben dicht über der Flüssigkeit ein Näpfchen mit 40proz. KOH bzw. mit H_2O. Nährlösung (je Kolben 200 ccm): H_2O 100, Dextrose 5, NH_4NO_3 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125, Fe (als $FeSO_4$) 0,001, $ZnSO_4$ 0,0001.

Die ganze Apparatur ohne die Kugelapparate wurde ½ Stunde im strömenden Dampf sterilisiert, dann sofort an die Kugelapparate angeschlossen und auf der anderen Seite abgeklemmt, so daß die bei der Abkühlung eindringende Luft die Kalilauge passieren mußte. Am 2. Oktober 1925 wurde mit Sporen geimpft und sofort bei 17° an die Saugpumpe angeschlossen. Am folgenden Tage wurde bei 27° an der Saugpumpe weiter kultiviert. Hier wie auch später wurde die Kultur stets 1 Tag bei einer für Aspergillus niedrigen Temperatur stehengelassen, um die Keimung zu verzögern und der endgültigen Absorption der Kohlensäure genügend Zeit zu lassen. Am 5. Oktober: KOH erneuert, unter Abklemmen beider Kulturen. Mit CO_2 zeigte bereits deutliche Mycelinseln, ohne CO_2 noch nichts. Hier wurden erst am 6. Oktober zwei schwache Mycelinseln sichtbar; von da an nahm das Wachstum rasch zu. Am 8. Oktober hat ohne CO_2 lauter kleine Mycelinseln, mit CO_2 eine nicht völlig zusammenhängende Decke. Das Frischgewicht der Mycelien war mit CO_2 8,5 g, ohne CO_2 3,5 g.

Dergleichen Versuche wurden wiederholt durchgeführt, immer wieder mit demselben Ergebnis: Die Kohlensäure hat offenbar auf Keimung oder Wachstum von Aspergillus oder auf beide Vorgänge einen großen Einfluß. Allerdings konnte niemals die Keimung völlig verhindert werden; das ist aber nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, daß gewissermaßen der Anstoß zur weiteren Entwicklung gegeben ist, sobald auch nur eine einzige Spore gekeimt ist, da der Pilz dann ja selber Kohlensäure produziert.

2. Versuchsanordnung. Weiter wiederholten wir den geschilderten Versuch mit kleinen Abänderungen. So wurde die Natronlauge durch Natronkalk ersetzt; oder wir verwendeten statt der Erlenmeyerkolben große 1 Liter fassende Bechergläser (ohne Ausguß) und saugten die Luft ab durch eine Saugkapsel von fast der Breite des Becherglases (eine allseitig geschlossene, auf der breiten Seite perforierte Glasglocke), die mit Natronkalk bzw. Glasperlen gefüllt war und dicht über der Flüssigkeitsoberfläche

endigte. Ferner kochten wir das Wasser der Nährlösung nach Zusatz einer Spur Schwefelsäure vor der Verwendung 8 bis 10 Stunden aus. Niemals aber war das Ergebnis anders. Nur *einmal* war zwischen ohne und mit CO_2 kein Unterschied zu bemerken, als nämlich die *fertige* Nährlösung vorher 8 Stunden gekocht worden war und der Zucker in braune Huminstoffe übergegangen war (feinflockiger Niederschlag). Doch braucht auf diesen ganz anomalen Fall kein Gewicht gelegt zu werden.

3. Versuchsanordnung. Zur endgültigen Entscheidung unserer Frage wendeten wir nun noch weitere Vorsichtsmaßregeln und Änderungen an: Mit 0,005 Proz. Fe anstatt 0,001 Proz., aber sonst gleicher Nährlösung. Die Anordnung der Apparatur war etwas verändert, indem die Luft bei mit CO_2 nicht durch destilliertes Wasser, sondern durch mit Schwefelsäure schwach angesäuerte Kochsalzlösung vor dem Eintreten in das Kulturgefäß geleitet wurde. Vor und nach dem Versuch wurde der Unterdruck in beiden Kulturgefäßen durch ein Manometer kontrolliert: er war in beiden gleich. Der Verlauf des Versuchs war wie oben geschildert und wurde ebenfalls mehrmals mit gleichem Ergebnis wiederholt. Es ergab sich z. B.: mit CO_2 11,5 g, ohne CO_2 6,5 g.

4. Versuchsanordnung. Weiter wendeten wir noch folgende Änderung des Versuchs an: Bei beiden Kulturgefäßen ließen wir die Luft vor dem Eintreten in das Kulturgefäß erst durch die gleiche verdünnte Schwefelsäure streichen, so daß sie in beiden Fällen (mit und ohne CO_2) mit der gleichen Dampfspannung in dem Kulturgefäß ankommen mußte. Diese Vorsichtsmaßregel war notwendig in Hinsicht auf die Versuche von *Walter*[1]) über die Bedeutung der Dampfspannung für das Wachstum, wenn dieser Umstand allerdings auch bei unseren Versuchen keine ganz ausschlaggebende Rolle spielen konnte, da wir ja auf verdünnter Nährlösung kultivierten. Abgesaugt wurde durch die bereits erwähnte (diesmal leere) Saugkapsel.

Die Nährlösung war: H_2O 100, Dextrose 2,5, $(NH_4)_2SO_4$ 0,5, KH_2PO_4 0,1, $MgSO_4$ 0,05, Fe (als $FeSO_4$) 0,005, $ZnSO_4$ 0,0001. Das Wasser für die Nährlösung bei diesem wie auch den folgenden Versuchen wurde einem größeren Vorrat von schwach angesäuertem, 2 Stunden lang gekochtem und dann über 40proz. Kalilauge aufbewahrtem destilliertem Wasser entnommen. Dementsprechend wurde nicht mehr sterilisiert. Nach reichlicher Beimpfung am 21. Dezember 1925 an die Saugpumpe angeschlossen; abends bis zum anderen Morgen im kalten Zimmer, dann bei 25° weiter kultiviert. Am 23. Dezember kann makroskopisch nur bei mit CO_2 Keimung festgestellt werden, bei ohne CO_2 erst am nächsten Tage. Ernte am 25. Dezember Trockengewicht: mit CO_2 0,88 g, ohne CO_2 0,30 g.

Es sei nochmals ausdrücklich bemerkt, daß bei dem eben beschriebenen Versuch alle Bedingungen gleich waren (Unterdruck im Kulturbecher, Dampfspannung der einströmenden Luft usw. bis auf die Kohlensäure). Daneben liefen noch weitere Versuche von einfacherer Anordnung.

5. Versuchsanordnung. Unter einer mit Vaseline gut abgedichteten Glasglocke stand eine Schale mit 40proz. Kalilauge bzw. unter einer anderen mit 40proz. Schwefelsäure oder auch mit Chlorcalcium. Auf dieser Schale stand ein Drahtnetz mit einem die Nährlösung enthaltenden Schälchen. Die Nährlösung wurde mit vorher 2 Stunden gekochtem Wasser angesetzt, kam heiß in die Schälchen und blieb bis zur Abkühlung unter der Glocke. Dann wurde geimpft, die Glocken natürlich sofort wieder geschlossen. Sie

---

[1]) *H. Walter*, Zeitschr. f. Botanik **16**, 353, 1924.

blieben erst 1 Tag bei niederer Temperatur stehen, dann im Brutzimmer. Trockengewicht nach 3 Tagen: mit CO_2 0,46 g, ohne CO_2 0,11 g. Bei einem gleichen, zu anderer Zeit angestellten Versuch war nach 3 Tagen bei mit CO_2 bereits ein kleines Mycel gebildet, ohne CO_2 die Sporen erst eben gekeimt. In dieser letzten Kultur lagen aber verhältnismäßig mehr Flöckchen am Grunde der Schale.

6. Versuchsanordnung. Von weiteren Versuchen sei noch folgender erwähnt: je 20 ccm Nährlösung [abgekochtes Wasser 100, $(NH_4)_2SO_4$ 0,5, KH_2PO_4 0,25, $MgSO_4$ 0,125. Spur *Mohr*sches Salz] wurden mit 80 ccm ausgekochten Wassers verdünnt und im Quarzkolben während mehrerer Stunden wieder auf 20 ccm eingedampft (zur möglichst vollständigen Austreibung der Kohlensäure). Dann wurden beide Lösungen mit je 1 Proz. Dextrose versetzt und sofort in der bei Versuch 5 beschriebenen Weise unter die Glocken gesetzt. Trockengewicht nach 2 Tagen: mit CO_2 0,06 g, ohne CO_2 0,004 g.

7. Versuchsanordnung. Da sich bei allen beschriebenen Versuchen herausgestellt hatte, daß offenbar insbesondere auch die Keimung durch das Fehlen der Kohlensäure verzögert wird, haben wir diesen Vorgang mikroskopisch verfolgt. Auf Objektträgern wurden Glasringe säurefest aufgekittet und 0,1 ccm 1- bis 2proz. Kalilauge bzw. 2- bis 4proz. Schwefelsäure[1]) hineingefüllt. Darauf wurden Deckgläser mit Wachs luftdicht gekittet, die auf der Unterseite eine dünn mit Sporen besäte Agarschicht trugen (abgekochtes Wasser 100, Saccharose 5, $(NH_4)_2SO_4$ 0,5, KH_2PO_4 0,2, $MgSO_4$ 0,1, Agar 1,5). Auch hier ließen wir erst 1 bis ½ Tag in der Kälte stehen und stellte sie dann ins Brutzimmer bei 25 bis 30°. Das mikroskopische, mit dem Zeichenapparat aufgenommene Bild eines dieser Versuche nach etwa 24 Stunden zeigt Abb. 1. Die Sporen über Schwefelsäure

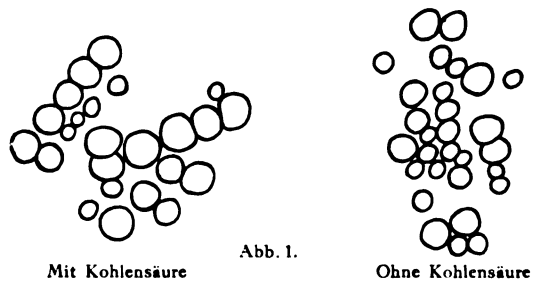


Abb. 1.
Mit Kohlensäure — Ohne Kohlensäure
bei gleicher Vergrößerung (etwa 200fach).

waren mit ganz wenig Ausnahmen schon gequollen bzw. an anderen Stellen schon gekeimt, während die über Kalilauge noch ungekeimt und erheblich weniger gequollen waren. Man sieht an der Abbildung deutlich, daß die Sporen bei + CO_2 entweder voll gequollen sind oder gar nicht; es sind dies offenbar besonders „hartschalige", wenn wir einen für die Samen höherer Pflanzen üblichen Ausdruck anwenden wollen. Bei — CO_2 dagegen sehen wir alle Abstufungen von gänzlich ungequollenen zu bereits voll gequollenen,

[1]) Bei diesen und den folgenden Versuchen verwandten wir stets Schwefelsäure von etwa doppelt so hoher Konzentration wie Lauge, um die Dampfspannungsunterschiede möglichst ungünstig zu gestalten.

worin deutlich die Verzögerung in der Quellung zum Ausdruck kommt. Es sei hierbei noch ausdrücklich bemerkt, daß in obiger Abbildung für + CO_2 absichtlich eine Stelle mit besonders vielen ungequollenen Sporen ausgewählt wurde; an anderen Stellen fanden sich deren nur sehr wenige.

Das geschilderte Bild war nun bei vielen angestellten Versuchen dieser Art immer das gleiche: Schon nach 10 Stunden keimten die Sporen über Schwefelsäure, und zwar alle gleichmäßig, nur wenige blieben ungekeimt. Zur selben Zeit waren stets die Sporen über Kalilauge noch alle oder größtenteils ungekeimt oder auch noch nicht gequollen. *Wenn nun über Kalilauge zu solch frühem Zeitpunkt hier und da schon Keimung eingetreten war, so war das stets an solchen Stellen der Fall, an denen die Sporen in dichten Haufen zusammenlagen. Und hier sah man stets, daß die Keimschläuche unten aus dem Knäuel herauskamen, niemals aus dem oberen oder den peripheren Teilen.* Offenbar also kommen sie aus Teilen, wo die Diffusion der Kohlensäure und damit ihre Entfernung gehemmt ist, wenn nicht das Wachstum in diesen Fällen sogar von anhaftenden Hyphenresten ausging, was wir nicht entscheiden konnten. Jedenfalls aber breitete sich von diesen Keimzentren aus das Mycel äußerst schnell über die ganze Agarschicht aus. Nach 15 bis 20 Stunden war in + CO_2 der Agar bereits dicht übersponnen, in − CO_2 waren erst einzelne Flöckchen sichtbar, nach weiteren 15 Stunden war jeder sichtbare Unterschied verwischt.

8. Versuchsanordnung. Es lag nun nahe, zu prüfen, ob eine Keimung der Sporen eintritt, wenn dafür gesorgt wurde, daß alle Sporen *einzeln* verteilt auf der Oberfläche des Agars zerstreut lagen. Es durfte dann natürlich nicht mit der Nadel geimpft werden; wir verfuhren folgendermaßen: Petrischalen wurden mit einer Agarschicht beschickt und umgekehrt über eine Schicht 1- bis 2proz. Kalilauge bzw. 3- bis 4proz. Schwefelsäure in einer großen Schale gestülpt; außen umschichteten wir mit flüssigem Paraffin. Der Agar war vorher folgendermaßen beimpft: In reinem, wasserfreiem Äther[1]) wurde eine sehr dünne Sporenaufschwemmung hergestellt und von diesem 5 ccm auf die Agarschicht gegossen. Dann wurde der Äther schnell durch Blasen verdampft und die Petrischalen wie oben geschildert aufgestellt.

Nach etwa 30 Stunden bei 30° war der ganze Agar bei + CO_2 von jungem Mycel überzogen, bei — CO_2 war makroskopisch nichts zu sehen. Mikroskopisch zeigte sich aber, daß auch hier die einzeln liegenden Sporen eben gekeimt waren. Aber das ist auch vielleicht erklärlich; denn durch die Art und Weise der Impfung liegt durchaus die Möglichkeit vor, daß die Sporen fest an die Agarschicht gepreßt werden und hierdurch die Diffusion der Kohlensäure erschwert wird. Im übrigen ist ja der Unterschied wie bei den früher geschilderten Versuchen vorhanden.

Wenn wir nun nach der allgemeinen Bedeutung der hier geschilderten Versuche fragen, so stoßen wir leider auf die Tatsache, daß man sich

[1]) Wasserfreier Äther, Alkohol, Chloroform dringt ja bekanntlich in die trockenen Sporen nicht ein.



bisher, von den Autotrophen abgesehen, mit der Wirkung der Kohlensäure auf die normale Pflanzenzelle noch kaum befaßt hat. Es liegen nur, wie unter anderem bei *Chapin*[1]) einige Angaben über die narkotische Wirkung sehr hoher Konzentrationen oder über die „Reizwirkung" von Konzentrationen von etwa 1 bis 2 Proz. vor: Das Wachstum höherer Pflanzen wird gefördert. Den völligen Abschluß von der Kohlensäure der Luft hat man aber überhaupt noch nicht berücksichtigt. Der Begriff „Reizwirkung" besagt zunächst natürlich noch gar nichts. Uns scheint es, daß die Wirkung der ja in jedem lebenden Organismus gebildeten Kohlensäure nur verstanden werden kann, wenn man versucht, ihr ganz allgemein eine im Stoffwechsel *notwendige* Rolle zuzuweisen, sie nicht nur als ein Exkret aufzufassen, das möglichst schnell aus der Zelle entfernt werden muß. Dieser Vorstellung würde auch die oben erwähnte „Reizwirkung" der Kohlensäure zwanglos eingliedern. Andeutungen zu notwendigen Funktionen bis zum Ausscheiden sind vorhanden. So rechnet man seit *Pantanelli*[2]) damit, daß die Kohlensäure ein notwendiges Vehikel für die Nährstoffaufnahme sei in Hinsicht auf Ionenaustausch. Diese Funktion kommt jedoch bei unseren Versuchen mit der ausgesprochenen Hemmung der Quellung nicht in Frage. Aus demselben Grunde scheint uns auch nicht eine etwaige versteckte Autotrophie des Aspergillus (die wir im übrigen durchaus für möglich halten und von welchem Gesichtspunkt die ersten Versuche angestellt wurden) der Grund für die beobachtete Kohlensäurewirkung zu sein. Stärker in Betracht gezogen hat man eine normale Rolle der Kohlensäure im tierischen Stoffwechsel; es soll hier nicht darauf eingegangen werden; wir begnügen uns, die einzige uns (nach Beendigung der mitgeteilten Versuche) bekannt gewordene Ansicht zu zitieren [*Nowy, Roehm, Soule*[3])], die von diesem Gesichtspunkt aus der Kohlensäure auch für den pflanzlichen heterotrophen Stoffwechsel eine bedeutsame Rolle zuweist (S. 110):

„The oxidation changes which take place within a unicellular organism, taken als a whole, are in no wise different from those of the constituent cells which go to make up the higher animal or plant. Carbonic acid is always the end-product in this combustion, and, in the case of aerobic organisms, it is in definite relation to the amount of oxygen consumed, that is to say, for a given medium the respiratory quotient is constant. Viewed only from one side, it is customary to state that such organisms require oxygen. This is true, but only in part, since there is good reason to believe that without carbonic acid such oxygen cannot be fully utilized by some organisms.

---

[1]) *P. Chapin*, Flora 1902, Ergänzungsband, S. 348.

[2]) *E. Pantanelli*, Jahrb. f. wiss. Bot. **56**, 689, 1915.

[3]) *F. G. Nowy, H. R. Roehm* und *M. H. Soule*, Journ. of infectious Diseases **36**, 109, 1925.

Carbonic acid is essential to the life of higher animals; its decrease by overventilation leads to startling and even serious results. Waste product though it is, it is indispensable as a stimulus to the respiratory center, and is thus of benefit to the body complex. It may therefore be laid down, as a working hypothesis, that carbonic acid is an equally essential stimulus for the growth of unicellular organisms. Evidence for this view is to be sought among the slow-growing organisms, but as yet it has not been produced."

Versuche haben die Verfasser keine gemacht. Eine weitere Angabe von *Rockwell*[1]) über die Notwendigkeit der Kohlensäure für Anaeroben dürfte, da die Dampfspannung nicht berücksichtigt wurde, kaum entscheidend in Frage kommen.

Für die vorliegende Frage muß nun, wenn wir die mögliche Funktion der Kohlensäure ins Auge fassen, zunächst unterschieden werden zwischen Wachstum und Quellung. Es wäre ja möglich, daß die von uns festgestellten Unterschiede lediglich auf die verzögerte Quellung der Sporen zurückzuführen wären, das spätere Wachstum aber nicht beeinflußt wird. Wir glauben aber, daß diese Frage an sich gegenstandslos ist, da die Quellung ja nichts anderes bedeutet, als daß die lebende Substanz in den wachstumsfähigen Zustand übergeht; beide fallen also in diesem Sinne zusammen, wie ja besonders aus den Versuchen von *Walter*[2]) hervorgeht.

Dann würde sich aber nur die eine Folgerung ergeben können, daß nämlich die Kohlensäure offenbar allgemein notwendig ist insofern, als sie den Protoplasten in den richtigen, für den arbeitenden Protoplasten richtigen, Quellungszustand bringt. Ob dies, nach naheliegenden Vorstellungen, durch eine Pufferwirkung der Kohlensäure, also Herstellung der geeigneten Wasserstoffionenkontration[3]), zustande kommt, oder ob noch andere Momente (etwa unmittelbare chemische Bindung usw.) beteiligt sind, ist eine sekundäre, zurzeit nicht zu entscheidende Frage. Ebenso muß es unentschieden bleiben, welche Bestandteile des Protoplasten in erster Linie für diese CO_2-Wirkung in Frage kommen.

Ein Einwand wäre noch in der Richtung zu machen, daß nicht die Quellung des Protoplasten, sondern diejenige der Zellmembran beeinflußt wird, daß die letztgenannte also durch CO_2-Wirkung erst permeabel würde. Wir halten dies jedoch nicht für die primäre Ursache,

---

[1]) *E. G. Rockwell*, Journ. of infectious diseases **35**, 581, 1924.

[2]) *H. Walter*, Zeitschr. f. Bot. **16**, 353, 1924. Ferner: Der Wasserhaushalt der Pflanze in quantitativer Betrachtung. Heft 6 der Sammlung *Boas*, Naturwissenschaft und Landwirtschaft. Freising, F. P. Datterer, 1925.

[3]) Auch außerhalb der Zelle, in der Kulturflüssigkeit, spielt die Kohlensäure eine Rolle als Puffersubstanz (*S. Sierakowski* und *R. Zaydel*, diese Zeitschr. **152**, 111, 1924).

denn es hätte dann in unserem Falle ohne CO_2 überhaupt keine Quellung eintreten können, da der von der Zellwand umschlossene Protoplast ja im Ruhezustande ist, somit erst quellen müßte, um Kohlensäure zu produzieren, welche die Zellmembran zur Quellung bringen könnte. Das setzt allerdings voraus, daß alle Kohlensäure restlos aus der Kultur entfernt wäre, was wir vielleicht nicht ohne weiteres als sicher annehmen dürfen.

Wir sind uns wohl bewußt, daß unsere mitgeteilten vorläufigen Versuche, die von anderer Seite weiter ausgebaut werden sollen, erst kleine Tastversuche sind, die Wirkung der Kohlensäure bis zu ihrem Austritt aus der Zelle bei den Pflanzen aufzuklären, natürlich von der Wirkung bei der Autotrophie abgesehen. Aber wir halten es für durchaus wünschenswert, diesen bisher fast noch gar nicht beachteten Fragekomplex anzuschneiden.

Zusammenfassung.

Entfernt man die Kohlensäure der Luft, so entwickelt sich *Aspergillus niger* aus Sporen sehr schlecht. Es wird die Vorstellung entwickelt, daß die Kohlensäure für *jede* arbeitende Pflanzenzelle notwendig ist und nicht nur als Exkret betrachtet werden darf. Es scheint, daß die Kohlensäure den richtigen Quellungszustand des Protoplasten gewährleistet.

Über die Fibrinogenbildung.

Von

Franz Faludi.

(Aus der II. internen Klinik der Budapester königl. ung. Péter-Pázmány-Universität.)

(Eingegangen am 10. März 1927.)

Die Fibrinogenbildung könnte laut der diesbezüglichen Untersuchungen von *Levi-Crailsheim* folgendermaßen vorgestellt werden.

Aus dem Hämoglobin der zerfallenen roten Blutzellen wird in den sogenannten Sternzellen des Reticuloendothelialsystems erst Hämatinglobin, dann Bilirubinglobin gebildet. Das Bilirubinglobin unterscheidet sich insofern von dem durch die Leber abgesonderten Gallenbilirubin, daß es, ein größeres Molekül bildend, eigentlich aus zwei Teilen, aus dem Gallenbilirubin und aus einem bisher noch nicht näher bekannten Eiweiß entsteht. Es kann chemisch mit der von *Hymans v. den Bergh* beschriebenen Diazoreaktion von dem Gallenbilirubin unterschieden werden, da das an Eiweiß gebundene Bilirubin im Gegensatz zu dem anderen keine direkte, sondern eine indirekte Reaktion ergibt. Die Behandlung mit Alkohol bezweckt eine Eiweißabspaltung, das frei werdende Bilirubin wird die direkte Diazoreaktion ergeben. Bei normalen Verhältnissen ist dieses Bilirubinglobin im Blute vorhanden, das bei gewissen, hauptsächlich mit Hämolysis verbundenen Krankheiten hohe Werte zu erreichen pflegt. Das Bilirubinglobin wird nicht von den Nieren durchgelassen, deshalb wird selbst bei verhältnismäßig starker Gelbsucht kein Gallenfarbstoff im Harn vorzufinden sein. Das Bilirubinglobin gelangt im Organismus in ungespaltenem Zustande in die Leberzellen, wo es auf Anregung der proteolytischen Fermente in zwei Richtungen zur Ausscheidung gelangt: in der Gallenleitung erscheint mit direkter Reaktion das Bilirubin, im Blute wird sich aber der gallenfarbstofffreie Eiweißbestandteil, das Globin, melden, das nach Anschauung des genannten Autors mit dem Fibrinogen identisch wäre. Diese Theorie hat er auch experimentell bestätigt. Wenn viel Bilirubinglobin enthaltendes Serum mit Leberzellen gemengt wurde, kam in einigen Fällen eine Wiedergerinnung desselben zustande, und in den vorher fibrinogenfreien Sera erschien wieder das Fibrinogen. Er versucht diese Erscheinung damit zu erklären, daß das Antiferment der Leberzellen das Bilirubinglobin in Bilirubin und Fibrinogen zerspaltet. Ebenso wird das eine indirekte Reaktion ergebende Blutserum nach Vermengung mit Magensäure nach einiger Zeit als Wahrzeichen einer Eiweißabspaltung eine direkte Reaktion aufweisen, zugleich verschwindet aber die indirekte Reaktionsfähigkeit.

Nach alledem gelang er zu der Konklusion, daß ähnlich der früheren Bilirubintheorie „*die Bildungsstelle des Fibrinogens ebenfalls die Leber-*

zelle sei", wo dieses parallel mit dem Bilirubin entsteht. Es wird aber auch von *Levi-Crailsheim* anerkannt, daß bei Vorgängen mit starker Leucocytose oder bei Zuständen, wo im Organismus proteolytische Fermente entstehen (Gravidität), die Bilirubinglobinspaltung auch außer der Leber auf Einwirkung der aus den Leucocyten frei werdenden oder aus anderen Gründen auftretenden proteolytischen Fermente vorzugehen vermag. Bei physiologischen Zuständen ist aber allein die Leber die Stätte der Fibrinogenbildung. Die Kupferzellen der Leber, die Reticuloendothelialelemente der Milz wie des Knochenmarks sind nur an der Bilirubinglobinbildung beteiligt. In dieser Form gelangt das Fibrinogen, an das Bilirubin gebunden, in die die Spaltung verrichtenden Leberzellen.

Die Menge des mit der Galle abgesonderten Bilirubins wird quantitativ den gesamten Hämoglobinverkehr andeuten (*Eppinger*). Insofern das Fibrinogen tatsächlich zum Bilirubin gebunden entsteht, wird uns diese Feststellung des Gallenverkehrs gestatten, die Fibrinogenbildung verhältnismäßig einfach quantitativ zu schätzen, denn wenn beide gemeinsam aus dem Hämoglobin hervorgehen, muß sich der Fibrinogengehalt des Blutes parallel mit der Gallenentleerung verändern.

Zur Erörterung dieser Frage haben wir uns mehrerer Hunde mit Gallenblasenfistel bedient und die Parallele der Bilirubin- und Fibrinogenwertveränderungen unter Einwirkung verschiedener Faktoren beobachtet.

Versuchstechnik.

Das Tier wurde nach Injektion von 2 ccm 1proz. Morphiumlösung mit Äther narkotisiert. Der Hautschnitt begann 3 cm unter dem Processus xyphoideus und endete in ähnlicher Entfernung unter dem Nabel. Nach Feststellung der Zahl der Gallenleitungen wurden die einzelnen Leitungen auf zwei Stellen, in einer Entfernung von 1½ cm abgebunden. Nach Beiseiteschieben der im Wege liegenden Leberläppchen haben wir den Gallenblasenfundus im Umfange eines 10-Pfennig-Stückes in die Bauchwandperitoneumschnittwunde ausgenäht. Binnen 24 bis 28 Stunden nach der Operation wurde die Gallenblase nach Ausziehen der Gallen mittels Punktionsspritze und steriler Kochsalzlösung durchspült. Die Eröffnung des ausgenähten Fundusteiles geschah am vierten und fünften Tage nach der Operation, in der Gallenblasenwunde wurde ein Schirmkatheter angelegt[1]). An das Ende des Katheters wurde zwecks Ansammlung der Galle ein mit Einteilung versehenes Glasgefäß angebracht. Die Tiere wurden für die Dauer des Experiments in einem ziegelförmigen, regulierbaren Leistengestell mittels des sogenannten Hängegürtels ausgebunden. Mit diesem Verfahren könnte die quantitative Gallensammlung auch trotz

[1]) Es sei mir hier gestattet, den Herren Dr. *J. Schaffler*, Universitätsassistent, und Dr. *G. Csongor*, Operateur, die mir die auf diese Weise operierten Tiere zur Verfügung stellten, meinen innigsten Dank auszusprechen.

starker Unruhe des Tieres gesichert werden. Wir haben erst dann mit den Experimenten begonnen, als sich die abgesonderte Galle als physiologisch erwies.

Zur Feststellung des Fibrinogengehalts im Blute hatten wir uns der *Leendertz-Gromelski*schen Verfahren bedient. Dem Hunde wurde aus der Vena saphena des Hinterschenkels mit der Spritze zu der 1 ccm 3,55proz. Natriumcitratlösung, welche in diese vorher aufgesogen wurde, 4 ccm Blut entnommen. Das zentrifugierte Plasma wurde nach gehörigem Rühren mit einem Fünftel 1,5proz. Calciumchloridlösung gemengt, dann im *Pulfrich*schen Refraktometer die Refraktion der Mischung festgestellt. Mit gewisser Geschicklichkeit kann bei diesem Verhältnis der Mischung der Refraktionsindex noch vor der Gerinnung festgestellt werden. Den übrigbleibenden Teil des Calciumchloridplasmas lassen wir frei gerinnen. Jetzt wird die Refraktion des nach der Gerinnung sich absondernden wasserklaren Serums gleichfalls festgestellt. Die Differenz der beiden Werte wird mit 0,215 multipliziert; erhaltene Zahl ergibt unmittelbar den Fibrinogenprozentsatz[1]).

Die Menge des mit der Galle abgesonderten und im Blute anwesenden Bilirubins haben wir mit dem *Hymans v. den Bergh*schen kolorimetrischen Verfahren festgestellt. Dem Tiere wurden von der Vena saphena des Hinterschenkels 5 ccm Blut entnommen. 1 ccm des frei werdenden Serums wurde nach erfolgter Gerinnung im Zentrifugenrohr mit 2 ccm 99proz. Alkohol gemengt. Den entstehenden Niederschlag zentrifugierend, wurde 1 ccm der sich oben absondernden klaren Flüssigkeit mit der Pipette in den kleineren Keil des *Autenrieth*schen Kolorimeters eingemessen. Es werden weiterhin 0,25 ccm Diazomischung (9,8 ccm Diazo I + 0,2 ccm Diazo II) und 0,5 ccm Alkohol beigetan. Nach Vergleich mit der Farbenintensität der Standardflüssigkeit wird bei gleicher Intensität die entsprechende Zahl notiert (x):

$$0{,}5 \cdot \frac{100 - x}{100} \cdot 5 = \text{Bilirubinmenge in 100 g Serum, ausgedrückt in Milligramm.}$$

Als Standardlösung haben wir nach dem neueren Verfahren von *Hymans v. den Bergh* Kobaltsulfat verwendet (2 g wasserfreies Kobaltsulfat in 100 ccm Wasser aufgelöst).

Die Bestimmung des Gallenbilirubininhalts wurde auf gleiche Weise durchgeführt, hier wurden aber wegen der großen Bilirubinmenge vorher entsprechende Verdünnungen vorgenommen.

Die Viskosität wurde mit dem *Hess*schen Viskosimeter bestimmt. Zwecks quantitativer Bestimmung der Bluteiweiße hatten wir uns des *Pulfrich*schen Refraktometers bedient.

Nach unseren Berechnungen sollte bei normalen Zuständen die Bilirubinausscheidung des Hundes pro Kilogramm Körpergewicht 1 cg betragen und der Fibrinogengehalt seines Blutes zwischen 0,2 bis 0,3 Proz. schwanken.

[1]) Da das Calciumchloridplasma gar oft schon vor nötiger Erwärmung bzw. Abkühlung der Prismen gerinnt, wäre es zweckmäßig, zur Kontrolle einen Teil des Citratplasmas statt mit Calciumchlorid in gleichem Maße mit einer Kochsalzlösung von derselben Refraktion zu verdünnen und deren Refraktion zu bestimmen.



Zwecks näherer Prüfung des Zusammenhangs zwischen der Fibrinogenbildung und dem Blutbilirubinwert haben wir uns zwei womöglich verschiedene Blutstrukturen ausgewählt. Zu diesem Zwecke erschien uns das Menschen- und Hundeblut für die Experimente äußerst geeignet.

Nach *Levi-Crailsheim* sollten nämlich die einzelnen Tierarten recht verschiedene Fibrinogen- und Bilirubinwerte aufweisen können. Viel Bilirubin sei gewöhnlich mit wenig Fibrinogen verbunden und umgekehrt. Wir haben daher das sehr rasch gerinnende und wenig Bilirubin enthaltende Hundeblut und das bedeutend langsamer gerinnende und viel Bilirubin besitzende Menschenblut zum Gegenstand unserer Prüfungen gemacht. Aus unseren Bestimmungen ergab sich aber, daß dieser Zusammenhang nicht allzu standhaft ist. Obzwar das Hundeblut eine viel raschere Gerinnung aufweist, konnte dennoch kein größerer Fibrinogeninhalt als bei dem Menschen nachgewiesen werden. Die starke Gerinnbarkeit sollte daher eher mit einer Fermentvermehrung begründet werden können. Die Blutzellen gehen sehr rasch, manchmal sogar während der Blutentnahme, zugrunde. Dies wird auch von der vom Hämoglobin roten Farbe des nach der Gerinnung sich absondernden Serums angedeutet.

Nach den Versuchen von *Brugsch, Stransky* und *Schaffler* kann eine ausgeprägte cholagoge Wirkung und zugleich eine wesentliche Vermehrung der Gallenfarbstoffausscheidung nur von zwei Mitteln, von dem Atophan und von den Gallensäurederivaten erwartet werden. Wir hatten in unseren Versuchen den Hunden mit Gallenblasenfistel 1 g Atophannatrium bzw. 10 ccm Decholin intravenös verabreicht. Die Fibrinogenbestimmung wurde 4 bis 8 Stunden nach der Eingabe unternommen. Die Galle wurde zweistündlich quantitativ gesammelt und in diesen einzelnen Portionen die Menge des Gallenfarbstoffes festgestellt.

Wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, *folgte selbst einer zweifachen Zunahme der Gallenfarbstoffentleerung keine Fibrinogenzunahme*. Im Gegenteil, es wurde sogar eine entschiedene Abnahme dieser Werte beobachtet. Die nach 24 Stunden bestimmte Fibrinogenquantität verhielt sich aber wieder innerhalb der normalen Grenzen.

Tabelle I[1]).

	2 Std. vor dem Versuch	10 bis 12 Std.	12 bis 14 Std.	14 bis 16 Std.	16 bis 18 Std.
Abgesondertes Bilirubin in mg ausgedrückt	5,0	8,0	8,4	10,0	9,6
Fibrinogeninhalt des Blutes in Proz. .	0,23	0,19	0,19	0,17	0,21

[1]) Zwecks Raumersparnis haben wir in unseren Tabellen nur einige charakteristische Zahlen unserer Versuche angegeben.

Foxterrier, 5,5 kg schwer, erhielt um 10 Uhr 1 g Atophannatrium intravenös.

Die Hunde hatten sich bei unseren Versuchen verschieden benommen. Bei der einen Gruppe erreichte der Fibrinogenwert schon nach 8 Stunden die normalen Grenzen, bei der anderen wurde selbst nach 16 Stunden keine Rückkehr zum ursprünglichen Zustande beobachtet (Tabelle II).

Tabelle II.

Körpergewicht kg	Fibrinogengehalt in Prozenten vor dem Versuch	8 Std. nach der Injektion	nach 16 Std.
5,5	0,22	0,18	0,20
4,0	0,23	0,17	0,16
10,2	0,20	0,21	0,20
8,4	0,25	0,25	0,24

1—1 g Atophannatrium intravenös.

Nach näheren Untersuchungen fiel es auf, daß jene Hunde, bei denen die Rückkehr der Fibrinogenwerte aus dem Normalzustande hinausgeschoben war, *alle von bedeutend kleinerem Körpergewicht waren* als die übrigen. Die eingegebene Atophandosis war bei allen 1 g. Also auf das Körpergewicht umgerechnet, erhielten die minder entwickelten Hunde *eine größere Dosis Atophan* als jene mit schwererem Körpergewicht. Es wurde auf Grund der oberen Theorie festgestellt, daß das Atophan durch die vermehrte Gallenfarbstoffentleerung die Blutfibrinogenwerte erhöht. Die Abnahme des letzteren war daher desto auffallender. Als aber die Quantität des gesamten Bluteiweißes festgestellt wurde, wurde sogleich die Ursache der Abnahme bekannt. In sämtlichen Fällen hat die Menge des Gesamtbluteiweißes parallel mit dem Fibrinogen abgenommen, d. h. *die Atophaninjektion verursachte in jedem Falle eine vorübergehende Hydrämie* (Tabelle III). Die Ursache der Fibrinogenverminderung sei unserer Meinung nach die Hydrämie. Dies bestätigt auch jener Umstand, daß nach dem Aufhören der Hydrämie auch der Fibrinogengehalt wieder das normale Niveau erreicht. *Mit der Hydrämie parallel nahm auch die Viskosität des Blutserums ab.*

Tabelle III.

Blutfibrinogengehalt in Prozenten		Gesamteiweißgehalt in Proz.		Viskosität	
vor der Injektion	4 Std. nach der Injektion	vor der Injektion	4 Std. nachher	vor der Injektion	4 Std. nachher
0,23	0,20	7,85	7,08	1,72	1,67
0,25	0,21	7,20	6,34	1,74	1,59
0,26	0,22	8,05	7,10	1,72	1,63
0,24	0,19	8,42	7,31	1,77	1,70
0,29	0,23	8,11	7,09	1,74	1,63

Nach intravenöser Eingabe von 1 g Atophannatrium bei Hunden von 4,5 bis 8 kg.

Diese Erscheinung konnte auch bei den Versuchen an Kranken beobachtet werden, unabhängig davon, ob der Patient ikterisch war oder nicht. Auch hier war die parallele Abnahme des Blutserumeiweißes zu verzeichnen (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Nach intravenöser Eingabe von 1 g Atophannatrium.

Diagnose	Geschlecht	Fibrinogengehalt Proz.		Gesamteiweißgehalt Proz.		Viskosität	
		vor der Injektion	4 Std. nachher	vor der Injektion	nach 4 Std.	vor der Injektion	nach 4 Std.
Ikterus cath. . .	♂	0,35	0,31	7,20	6,42	1,64	1,56
Neurosis ventr. .	♂	0,29	0,25	7,90	7,01	1,71	1,62
Tbc. pulmonum .	♀	0,40	0,29	8,85	7,99	1,80	1,72
Carc. ventriculi .	♂	0,35	0,31	7,96	7,12	1,73	1,63
Tabes dors. . .	♀	0,22	0,20	7,50	6,64	1,67	1,58

Nach den Tierversuchen von *Schaffler* sollte bei einer Gallenwegversperrung, z. B. bei Choledochusunterbindung, die Steigerung der Gallensekretion deren Resorption bzw. Zunahme des Ikterus verursachen. Er hat nach der Verwendung eines wirksamen Gallentreibemittels einen geringen Aufstieg des Serumbilirubins beobachtet. Die Angaben von *Grunnenberg* sind scheinbar widersprechend, laut diesen war nämlich bei den ikterischen Patienten nach der Atophanverabreichung die Abnahme der Serumbilirubinwerte zu verzeichnen. Dieser Gegensatz kann aber mit der Hydrämie verursachenden Wirkung des Atophans überbrückt werden. Der Bilirubinwert nimmt nämlich bei anhaltender Hydrämiewirkung ab, wenn aber die Resorption gesteigert wird, kann eine Zunahme beobachtet werden. Die Verminderung des Bluteiweißes kann auch 10 bis 15 Proz. betragen.

Die Verringerung der Fibrinogenwerte hörte gewöhnlich binnen 8 Stunden auf, obzwar die Gallenfarbstoffabsonderung zumal noch stark vermehrte Werte ergab. Es waren aber Fälle — wo das Tier im Verhältnis zum Körpergewicht zu große Atophandosis erhielt —, da erreichte der Fibrinogenwert erst in 20 bis 24 Stunden den normalen Stand. In diesen Fällen mußte das Tier nach der Injektion einen förmlichen Kollaps erleiden. Der Beginn der Gallensekretion war verzögert und geschwächt, das Tier bot im allgemeinen das Bild eines schwer kranken Organismus dar. In diesem Falle hält die Fibrinogenabnahme (Hydrämie) länger als gewöhnlich an, diese längere Frist deutet die Schädigung des Organismus an.

Ähnlich waren die Ergebnisse nach intravenösen Injektionen von Dehydrocholsäurepräparaten. *4 Stunden nach Eingabe von 10 ccm Decholin hat sich eine ausgeprägte Hydrämie eingestellt, gepaart mit einer gleichzeitigen Abnahme des Gesamteiweiß- und Fibrinogengehalts*

und Viskositätsverminderung des Blutes. Diese Erscheinungen verschwanden aber spurlos bis zum nächsten Tage.

Tabelle V.

Nach intravenöser Injektion von 10 ccm Decholin bei Hunden von 4 bis 8 kg.

Fibrinogengehalt Proz.		Gesamteiweißgehalt Proz.		Viskosität	
vor der Injektion	nach 4 Std.	vor der Injektion	nach 4 Std.	vor der Injektion	nach 4 Std.
0,28	0,23	7,20	6,45	1,64	1,56
0,30	0,25	6,84	5,96	1,60	1,52
0,25	0,22	7,42	6,92	1,65	1,60
0,24	0,20	7,95	7,21	1,71	1,64
0,29	0,24	8,04	6,94	1,72	1,63

Es ist wahrscheinlich, daß die nach Atophan und Decholin sich meldende Hydrämie mit dem Wirkungsmechanismus der Gallentreibemittel zusammenhängt. Unsere die Klärung dieser Frage bezweckenden Versuche sind augenblicklich im Gange.

Nach der obenstehenden Theorie sollten jene Mittel, die zur Vermehrung des Fibrinogens im Blute beitragen, auch eine gesteigerte Bilirubinabsonderung verursachen. Dies zu prüfen, wurden Hunden mit Gallenblasenfistel 10 ccm 10proz. Gelatine bzw. 1 ccm Novoprotin intramuskulär verabreicht. Eine bedeutendere Fibrinogenzunahme hat aber keines der Mittel ergeben, wir konnten wegen Mangel an geeigneten Wirkungsmitteln auf diese Frage keine zufriedenstellende Antwort erhalten.

Es konnte zwischen dem Fibrinogengehalt des Blutes und zwischen der Bilirubinsekretion kein Parallelismus entdeckt werden. Es könnte jener gerechtfertigte Widerspruch gestellt werden, daß der auf einmalige Gallentreibung entstehende Fibrinogenüberschuß im Verhältnis zu der im Gesamtorganismus befindlichen Fibrinogenmenge so gering sei, daß es unmöglich ist, eine ausgeprägte Veränderung wahrzunehmen. Wir haben auch in dieser Hinsicht Versuche unternommen. Wir haben bei Hunden mit Gallenblasenfistel eine sechstägige Gallentreibung mit dem von *Stransky* für unschädlich bezeichneten, als physiologischer Reiz wirkenden Mittel, der Dehydrocholsäure, durchgeführt. Interessant war dabei jene Wahrnehmung, daß, obzwar die gesteigerte Gallensekretion ständig entschieden beobachtet werden konnte, sich die Gallenfarbstoffentleerung dennoch nicht parallel damit benahm. Die Menge des abgesonderten Bilirubins nahm am dritten Tage ab, die weitere Gallenfarbstoffentleerung wurde gleichmäßig. Es ist wahrscheinlich, daß zu diesem Zeitpunkt das sich im Organismus in präformiertem Zustande befindliche Bilirubin vollständig entleerte. Eine

weitere gesteigerte Absonderung könnte aber nur so zustande kommen, wenn in dem Reticuloendothelialsystem auf Einwirkung des Gallentreibemittels ein gesteigerter Zerfall der roten Blutzellen beginnen würde. *Die Änderung des Blutfibrinogengehalts ist aber selbst unter diesen Bedingungen nicht vorgekommen*, die Bilirubin- und Fibrinogenwerte haben sich voneinander unabhängig verändert.

Levi-Crailsheims Meinung, daß das Blutfibrinogen unter normalen Verhältnissen ausschließlich in der Leber aus dem sogenannten Bilirubinglobin entstünde, ist nicht besonders standhaft. Es widersprechen dem zahlreiche Versuchsdaten. Von *Müller* wird dagegen z. B. das Knochenmark für die Bildungsstelle des Fibrinogens gehalten. Nach der Einspritzung von getöteten Bakterien hat der Fibrinogengehalt des Knochenmarks stark zugenommen. Nach *Stephan* sollte die Röntgenbestrahlung der Milz die Gerinnungsfähigkeit des Blutes bedeutend steigern. Ähnliches hat *Traugott* nach Bestrahlung mit Ultraviolettstrahlen beobachtet. Diese Versuche heben die Wichtigkeit des Reticuloendothelialsystems hervor. *Mathews*, der in den Mesenterialvenen mehr Fibrinogen vorfand, als in den Arterien, vertritt ebenfalls einen entgegengesetzten Standpunkt. Seiner Meinung nach sollten die Leucocyten der Darmwand bei der Fibrinogenbildung eine rege Tätigkeit ausüben. Das Fibrinogen wird nach *Prevost*, *Mosso*, *Dumas* usw. aus den roten Blutzellen abgestammt, nach *Schmidt* sollte es durch Zellenelemente aus dem sogenannten Cytoglobin gebildet werden. Nach *Herzfeld* und *Klinger* sei das Fibrinogen das beträchtlichste aus dem Zellenprotoplasmaabbau entstehende Zerfallprodukt, das in der Reihe der Bluteiweiße den ersten Platz einnimmt. Es entsteht hauptsächlich aus dem Leucocytenplasma.

Es bestehen aber auch solche Versuche, die dahin weisen, daß dennoch die Leber die gewöhnliche Bildungsstätte des Fibrinogens sei. Nach *Whipple* soll bei Tieren nach dem Ausschließen der Abdominalzirkulation die Blutgerinnungsfähigkeit im Bereiche der Thorax- und Kopfzirkulation entschwinden. Nach den Versuchen von *Nolf* soll bei der Durchströmung einer überlebenden Leber eine Fibrinogenbildung beginnen. Unter normalen Verhältnissen ist der Fibrinogengehalt der Vena portae geringer, als der der Vena hepatica. Eine bedeutendere Leberzellenverheerung verursachende Erkrankung führt häufig zur Hypinosis. Wir wollen, die Aufzählung weiterer literarischer Daten vermeidend, die Diskussion derartig abschließen, daß die Rolle der Leber in der Fibrinogenbildung, *wenn auch nicht alleinstehend*, jedoch ohne Zweifel von Wichtigkeit ist.

Es ist recht merkwürdig, daß die Leucocytenzahl und der Fibrinogengehalt sich gewöhnlich parallel verhalten. Erkrankungen mit Leucocytosis weisen eine Hyperinosis auf. Der Zusammenhang beider Erscheinungen ist auffallend, daher stammt die Vorstellung von *Levi-Crailsheim*, daß das aus den Leucocyten frei werdende proteolytische Ferment auch ohne Mithilfe der Leberzellen im Blute das Bilirubinglobin in seine Bestandteile zu zersetzen vermag. Da die Leucocytosis als keine physiologische Erscheinung erachtet werden kann, muß auch diese Zersetzung für ein pathologisches Ereignis erachtet werden. Wahrscheinlicher ist aber, daß beide Erscheinungen ohne jeden kasuistischen Grund *nur in nebengeordnetem Verhältnis zueinander stehen*. Genannter Autor schreibt außer diesem proteolytischen Ferment auch anderen Fermenten eine zersetzende Wirkung zu. Er will z. B. die bei Gravidität von *Lepehne* entdeckte direkte Diazo-

reaktion damit begründen, daß das *Abderhalden*sche Placentazersetzungsferment ebenfalls das Bilirubinglobin zu spalten vermag, und es sollte demzufolge Fibrinogenzunahme auftreten. Wegen der spezifischen Natur der Schutzfermente ist es unwahrscheinlich, daß genanntes Ferment außer dem koagulierten Placentaeiweiß auch sonstiges natives Eiweiß zu spalten vermöge. Wir selbst vertreten eher jenen Standpunkt, den auch der Beobachter dieser Erscheinung vertritt. Bei dem wegen der Gravidität eine gesteigerte Funktion verrichtenden Organismus kann wegen der ungleichmäßigen Belastung eine geringere Funktionsstörung der einzelnen Organe entstehen. Die wegen der überwiegenden Inanspruchnahme der Leberzellen eine direkte Reaktion ergebende Hyperbilirubinämie ist mit der Schwangerschaftsalbuminurie vollständig analog.

Die früher dem direkten und indirekten Typus der Diazoreaktion zugemutete große Bedeutung wird übrigens immer mehr vernachlässigt. Eine scharfe Grenze kann zwischen beiden Erscheinungsarten der Reaktion schon deshalb nicht gezogen werden, weil Übergänge recht häufig vorkommen. Der Typus der Reaktion kann sich auf die verschiedensten Einwirkungen leicht verändern. Neuerlich wurde von *Eppinger* darauf hingewiesen, daß im Blutserum gleichzeitig ein eine direkte und indirekte Reaktion ergebendes Bilirubin vorkommen kann. Er hat sogar in Fällen, wo eine Gallenstauung gänzlich ausgeschlossen werden konnte, eine ausgeprägt direkte Reaktion erhalten. Seiner Meinung nach ist die indirekte Reaktion bei Ikterus hepatogenen Ursprungs gar nicht selten. An dieser Stelle wollen wir auch die Magensaftverdauungsversuche von *Levi-Crailsheim* erwähnen. Wenn er ein eine indirekte Reaktion ergebendes Bilirubin enthaltendes Serum einer Salzsäure-Pepsinverdauung unterwarf, wurde auch diese Reaktion direkt positiv, da das Pepsin die Eiweißkomponente des Bilirubinglobins zersetzte und dadurch das Gallenbilirubin frei wurde. Wir dürfen aber auch nicht vergessen, daß beide Reaktionsarten sich nur wenig unterscheiden. Wir sind jener Ansicht, daß die Acidität der ursprünglich neutralen Reaktion sowie die nach Pepsinverdauung entstehenden Zerfallsprodukte die Änderung der Reaktion genügend begründen.

Wir halten für überaus wichtig, uns mit jenem Versuch von *Levi-Crailsheim* zu befassen, daß das eine indirekte Reaktion ergebende Bilirubinglobin auf Einwirkung des in den Leberzellen befindlichen Ferments in Gallenbilirubin und Fibrinogen zersetzt wird. Wenn wir den entsprechend behandelten wässerigen Extrakt einer fibrinogenfreien Leber mit einem viel Bilirubin enthaltenden Serum zusammengießen, tritt eine gar interessante Reaktion ein. Die indirekte Reaktion wird direkt. In einem großen Teil der Sera kam wieder Fibrinogen zum Vorschein, bei manchem Serum konnte sogar eine Gerinnung beobachtet werden. Eine Fibrinogenbildung war aber nur bei solchen Mischungen sichtbar, die *frischen* Leberextrakt enthielten. Alte Extrakte haben

nur Reaktionstypveränderung verursacht. Der nach Vorschrift des Verfassers verfertigte frische Extrakt ist ziemlich trüb, klärt sich nur nach zwei- bis dreitägigem Stillstand bei Bildung eines feinen Niederschlags auf. Der auf diese Weise hergestellte Extrakt vermag die gesunde Leberfunktion nicht zu ersetzen. Laut der von *Herzfeld* und *Klinger* stammenden Theorie können im Organismus aus dem Protoplasma der Zellen ohne jede Schwierigkeit die verschiedensten Bluteiweiße gebildet werden. Es kann auch als experimentell erwiesen erachtet werden, daß die verschiedenen Bluteiweiße sich auch ineinander verändern können. Da die Identifizierung der Eiweiße im allgemeinen auf Grund ihrer Löslichkeit und Ausfallbarkeit geschieht, ist es wahrscheinlich, daß wesentlich verschiedene, in ihren physikochemischen Eigenschaften aber gleiche Stoffe in einer Gruppe gereiht werden. Den Serumgerinnungsversuchen könnte nur in jenem Falle eine beweisende Kraft zugeschrieben werden, wenn im beigemengten Wasserextrakt kein Eiweiß nachweisbar wäre. Wir wollen die Erörterung der ganzen Erscheinung in jenem Umstand ersehen, daß der dem Serum in doppelter Menge beigemengte Leberextrakt sehr wenig stabiles Zellendetritus und Eiweiß enthielt. Bei größerer Eiweißkonzentration hatte die vorhergehende Autolysis bei Thermostattemperatur die sonst nur nach Tagen erfolgende Ausflockung der Teilchen schon in wenigen Stunden vollbracht. *Das entstehende Fibrinogen entspricht kaum dem im Organismus befindlichen, allein ihre Ausflockbarkeit ist identisch.*

Auf Grund dieses kann die Fibrinogenbildung kaum mit der *Levi-Crailsheim*schen Auffassung begründet werden. Es erscheint uns, als wenn bei der Frage der Fibrinogenbildung jene Theorien sich einander gegenüberstünden, die wir bereits bei dem Bilirubin sahen. Der einen Anschauung nach sollte die Stätte der Fibrinogenbildung allein in den Leberzellen gesucht werden, da nach Exstirpation bzw. aus dem Kreislauf erfolgender Ausschließung der Leber auch die Fibrinogenbildung aufhört. Es bestehen aber über die Fibrinogenbildungstätigkeit der Milz und des Knochenmarks ebenfalls experimentell bestätigte Daten. Unsere Meinung, die der *Kisch*schen Auffassung am nächsten steht, könnte folgendermaßen kurz geschildert werden:

Milz, Knochenmark und Leber bilden ebenfalls Fibrinogen. *Das Fibrinogen entsteht im Reticuloendothelialsystem* wahrscheinlich aus weißen Blutzellen oder sonstigen Gewebszellen als erstes, verhältnismäßig großes, labiles, kolloidales Teilchen. Die Spaltung verläuft stets in der Richtung der immer kleiner werdenden Moleküle. Ohne Zweifel zirkuliert es im Kreislauf schon in einem gerinnungsbereiten Zustande. Es ist natürlich, daß die partielle Ausschließung des Reticuloendothelial-

systems die Abnahme der Fibrinogenbildung verursacht. Deswegen werden wir nach der Leberexstirpation eine starke Abnahme der Blutgerinnbarkeit vorfinden. Da die Verteilung des Reticuloendothelialsystems bei den einzelnen Tieren verschieden ist, muß es als natürlich erachtet werden, daß auch hier wie bei dem Auftreten des Ikterus sich feinere und gröbere Unterschiede melden. Das Reticuloendothelialsystem besitzt zwar jene Bereitschaft, den Ausfall eines Teiles mit gesteigerter Funktion eventuell Vermehrung des übrigbleibenden Teiles zu kompensieren. Ähnliche kompensatorische Vermehrung kann bei mit Suspensionen erfolgter Sättigung des Systems beobachtet werden. Vollständiges Verschwinden des Fibrinogens werden wir selbst bei den schwersten Lebererkrankungen im menschlichen Organismus kaum beobachten können. Bei Tierversuchen ist es eventuell möglich, vollständiges Aufhören der Fibrinogenbildung zu beobachten, die Ursache dessen ist aber, daß das stundenlange Überleben der Tiere für das Zustandekommen einer gewissen Kompensation ungenügend ist. Die Fibrinogenbildung vollzieht sich aber neben der Bilirubinproduktion ebenfalls in den Zellen des Reticuloendothelialsystems, wie aber unsere Versuche beweisen, voneinander unabhängig. Wir halten also den Unterschied zwischen normaler und pathologischer Fibrinogenbildung für falsch, zugleich schreiben wir auch dem proteolytischen Ferment der Leucocyten und den sogenannten Schutzfermenten ebenfalls keine Fibrinogenbildungsfähigkeit zu.

Zusammenfassung.

1. Die an Hunden mit Gallenblasenfistel unternommene Gallentreibung vermag trotz gesteigerter Bilirubinentleerung im Blute keine Fibrinogenvermehrung zu verursachen. Die Fibrinogenwerte nehmen im Gegenteil noch ab.

2. Die Ursache dieser Abnahme sei in der durch Phenylchinolincarbonsäure und Dehydrocholsäure verursachten Hydrämie zu suchen.

3. Die Viskosität des Serums nimmt parallel mit der Abnahme der Gesamteiweiße ab.

4. Die Dauer der Hydrämie beträgt unter normalen Verhältnissen 8 Stunden. Eine längere Dauer muß als die toxische Erscheinung einer übergroßen Dosis erachtet werden.

5. Selbst eine 6 Tage lang fortgesetzte Gallentreibung verursachte keine Fibrinogenvermehrung.

6. Nach Vereinigung der literarischen und experimentellen Daten erscheint es als höchst wahrscheinlich, daß das Fibrinogen unabhängig von der Bilirubinbildung im Reticuloendothelialsystem entsteht.

Literatur.

Brugsch-Horsters, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **38** u. **43**. — *Eppinger*. Spec. Path. und Ther. (*Kraus-Brugsch*) **4**, Hälfte II. — *Grunnenberg-Ulmann*, Med. Klinik. 1924, Nr. 20. — *Herzfeld-Klinger*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **20**; diese Zeitschr. **68**, 402, 1915; **71**, 391, 1915; **75**, 145, 1916; **82**, 289, 1917; **83**, 42, 1917; 88, 232, 1918. — *Kisch*, Klin. Wochenschr. 1923, S. 1452. — *Levi-Crailsheim*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **32**. — *Lepehne*, Ergebn. d. inn. Med. **20**, 1921; Deutsch. Arch. f. klin. Med. **132**, **135**; Zieglers Beitr. **64**. — *Mathews*, Amer. Journ. of Physiol. **3**. — *Mosso*, Virchows Arch. **109**, 1887. — *Müller*, Hofmeisters Beitr. **6**. — *Schaffler*, Magyar Orvosi Archiv 1927. — *Schmidt*, Zur Blutlehre 1892. — *Stransky*, diese Zeitschr. **155**, 256, 1925. — *Stephan*, Münch. med. Wochenschrift 1920, Nr. 11; Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 1921. — *Traugott*, Münch. med. Wochenschr. 1920, S. 344. — *Whipple*, Amer. Journ. of Physiol. **38**, 1914.

Zur Frage des Zustandes wässeriger Natriumuratlösungen.

Von

G. Ettisch, L. Farmer Loeb und B. Lange.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für physikalische Chemie und Elektrochemie, Berlin-Dahlem, und der I. medizinischen Universitätsklinik, Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 11. März 1927.)

Mit 9 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Bei den früheren Untersuchungen über den Zustand wässeriger Uratlösungen kam eine Gruppe von Forschern [*Lichtwitz* (1), *Gudzent* (2), *Kohler* (3)] zu der Ansicht, daß es sich hierbei um *echt gelöste* Salze in übersättigter Lösung handle. Die andere Gruppe [*Schade* (4), *Bechhold* und *Ziegler* (5), *R. Stern* (6)] dagegen behauptete, daß sich ein *kolloides* Stadium nachweisen lasse.

H. Freundlich und *L. Farmer Loeb* (7), die diese Frage wieder aufrollten, gelangten auf Grund theoretischer Erörterung ihrer Versuchsergebnisse zu der weitergehenden Anschauung, daß sich die Urate in wässeriger Lösung wie *Kolloidelektrolyte* im Sinne *McBains* verhielten.

Aus dem Gange der *Leitfähigkeit* alkalisierter und nachträglich neutralisierter Natriumuratlösungen, aus dem *optischen* Verhalten dieser Lösungen, aus dem Einfluß des *Erhitzens* sowie dem *Verlauf der* p_H*-Kurve* schließen *Freundlich* und *Loeb*, daß in diesen Lösungen *Kolloidteilchen* enthalten sein müßten. Auf der anderen Seite zeigten die Lösungen des Natriumurats *nicht* das Verhalten typischer Kolloide; es sind z. B. die Werte für die Leitfähigkeit reiner Uratlösungen sehr hoch. Dieser Erscheinung, zusammen mit den soeben genannten, wird aber genügt durch die Annahme des Vorliegens eines Kolloidelektrolyten.

War somit durch die vorangegangenen Untersuchungen die Frage nach dem Zustande wässeriger Natriumuratlösungen dahin zu beantworten, daß die *Annahme* des Vorliegens eines Kolloidelektrolyten die einleuchtendste Erklärung für die nachgewiesenen Erscheinungen bot, so stand dennoch ein *direkter* Beweis hierfür noch aus. Der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es, ihn nunmehr endgültig zu erbringen.

II. Depolarisation.

a) Theoretische Bemerkungen.

Ein typisches Kriterium für den kolloiden Zustand eines flüssigen Systems ist das Auftreten des Tyndallichtes. Zum besseren Verständnis des Nachfolgenden seien hier kurz einige physikalische Bemerkungen über dieses Phänomen erlaubt. Teilchen bis zur Größenordnung der Lichtwellenlänge, etwa 10^{-7} bis 10^{-4} cm Radius, *reflektieren* das Licht nicht mehr, sondern sind selbst Ausgangspunkt, Mittelpunkt einer Kugelwelle, die sich nach allen Seiten hin ausbreitet. Das Licht wird von diesen Einzelteilchen *abgebeugt*[1]). Dieses abgebeugte Licht schwingt nicht wie das natürliche, und auf das Teilchen einstrahlende Licht in *allen* Richtungen des Raumes, sondern zeigt eine *ausgezeichnete* Schwingungsrichtung, es ist *polarisiert*. Hierbei schwingt der elektrische Vektor senkrecht zu der Ebene, die durch Einfalls- und Beobachtungsrichtung gegeben ist.

Liegt daher umgekehrt bei einem flüssigen System *polarisiertes Tyndallicht* vor, so ist dieses *nur* möglich, wenn das betreffende System ein *zweiphasiges* ist, d. h. wenn in einem Kontinuum Teilchen enthalten sind, deren Abmessungen sich in dem oben angegebenen Bereich bewegen, mit anderen Worten: das Vorliegen eines *kolloiden*[2]) Systems ist die notwendige und hinreichende Bedingung für das Zustandekommen eines unter gewöhnlichen experimentellen Umständen gut wahrnehmbaren, polarisierten Tyndallichtes. Selbstverständlich ist hierbei das Vorliegen von *Fluoreszenz* auszuschalten, was unter Zuhilfenahme etwa der *Stokes*schen Regel gelingt.

In der theoretischen Physik wird das Problem der „Optik trüber Medien" eifrig verfolgt. Nächst den Arbeiten von *G. Mie* (8) sind es vor allem die von *R. Gans* (9), die hier bahnbrechend waren. Dieser konnte zeigen, wie sich die Abweichung der Teilchen von der Kugelform, — die den Ableitungen von *Mie* noch zugrunde lag, — auswirkt. Er zeigte ferner den Einfluß auf, den die Konzentration der dispersen Phase hat. Hierzu sei kurz bemerkt, daß *nicht immer alles* eingestrahlte natürliche, in allen Richtungen schwingende Licht eine Polarisation erfährt. Die Verhältnisse liegen vielmehr so, daß, je *kleiner* die Teilchen sind, je mehr sie sich also der unteren Grenze des oben angegebenen Bereichs nähern, je mehr sie also von *amikronischem* Charakter sind, das seitlich abgebeugte Licht in um so *stärkerem Maße polarisiert*, der *natürliche* Anteil also um so *geringer* ist. Bereits bei einem Teilchen-

---

[1]) Es sei aus *didaktischen* Gründen hier gestattet, die „Wellenoptik" zu trennen von der „geometrischen Optik". In Wirklichkeit besteht etwas Derartiges nicht.

[2]) Siehe auch S. 262, 1. Abschnitt.

radius von $r \leqq 5 \cdot 10^{-6}$ cm ist praktisch alles seitlich ausgestrahlte Licht polarisiert, *sobald diese Teilchen von der Kugelform nicht abweichen*. Liegt aber bei den dispergierten Teilchen auch nur eine geringe Abweichung hiervon vor, so enthält das seitlich ausgestrahlte Licht derartiger Systeme bereits *meßbare Anteile natürlichen* Lichtes, selbst bei Vorliegen der eben genannten Größenordnung für die Teilchenabmessungen.

Damit zeigt sich also, daß weiterhin die Teilchen*form* von wesentlichem Einfluß auf den Polarisationszustand ist. Dieses aber in dem Sinne, daß, je *größere* Abweichungen von jener allseitig symmetrischen Teilchenform vorliegen, desto *größer* auch der Anteil des natürlichen Lichtes im Tyndallkegel ist, desto *geringer* demnach der *polarisierte*. Es sei hier nur erwähnt, daß *R. Gans* durch Messung beider genannten Lichtanteile direkt die Teilchenform bestimmen konnte.

Weiterhin übt die *Konzentration* der dispersen Phase einen merklichen Einfluß auf das Verhältnis der Menge beider Lichtarten aus in der Weise, daß *amikronische*, *kugelförmige* Teilchen in *höherer* Konzentration außer polarisiertem Licht bereits auch natürliches abbeugen. Daher erweist es sich oft als notwendig, die Polarisation eines *Einzelteilchens* zu errechnen (Näheres darüber s. bei Versuch II).

Als *Depolarisation* bezeichnet man nun das Verhältnis der Intensitäten beider Lichtarten. Dabei ist der Depolarisations*grad* Θ definiert als das Verhältnis der Intensitäten von natürlichem und polarisiertem Lichte.

$$\Theta = \frac{N}{P} \quad \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \quad (1)$$

Hier bedeutet N die Intensität des natürlichen und P die des polarisierten Lichtes. Ist das Tyndallicht vollständig polarisiert, was, wie oben erwähnt, nur bei ganz kleinen kugelförmigen Teilchen der Fall ist, so wird der Depolarisationsgrad $\Theta = 0$ mit $N = 0$. Bei einer Teilchenvergröberung oder einer Formänderung wird die Depolarisation beträchtlicher und erreicht für allseitig schwingendes Tyndallicht den Grenzwert $\Theta = \infty$ mit $P = 0$. Bei gleichen Intensitäten beider Lichtarten wird naturgemäß $\Theta = 1$.

Zeigt demnach polarisiertes Tyndallicht einwandfrei *das Vorliegen* eines *kolloiden* Systems an, so gestattet es also die Messung des Depolarisationsgrades, *weitergehende*, nämlich *quantitative* Aussagen über das gerade vorliegende System zu machen. Diese erstrecken sich auf solche der Teilchen*zahl*, Teilchen*form*, Teilchen*größe* und *Menge der kolloiden Phase*.

b) Versuchsmethodik.

Es kann hier nicht auf alle Einzelheiten der Versuchsanordnung und Berechnungsart eingegangen werden. Näheres darüber bringt die Arbeit von *B. Lange* (10). Es soll nur hier das Prinzip angedeutet werden.

Für alle Versuche wurde ausschließlich als einfallender Strahl natürliches Licht verwandt. Beobachtet wurde *senkrecht zur Einfallsrichtung*. Daraus ergibt sich eine einfache Anordnung, die in Abb. 1 skizziert ist.

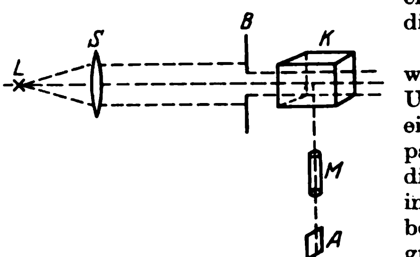


Abb. 1.

Der Krater einer Bogenlampe L wird durch ein Linsensystem S im Unendlichen abgebildet, und die durch eine quadratische Blende B begrenzten parallelen Lichtstrahlen gehen durch die zu untersuchende Lösung, die sich in einer *Leybold*schen Küvette K befindet. Da der Depolarisationsgrad eine Funktion des Brechungsindex ist, wird das Tyndallicht mit einem Monochromator M spektralrein monochromatisch gemacht und dann analysiert, d. h. die Intensität der vertikal und horizontal schwingenden Komponente bestimmt.

Versuch 1.

(Einfluß des Erhitzens.)

Ein wesentlicher Punkt der Untersuchung an Natriumurat ist die Frage nach dem Zustande rein wässeriger Natriumuratlösung und die Abhängigkeit dieses Zustandes von der Temperatur. Für diese und die weiteren Untersuchungen wurde das Natriumurat und dessen Lösung durchgehends hergestellt, so wie es *Freundlich* und *Loeb* (l. c.) ausführlich angegeben haben. Zur Untersuchung gelangten drei Lösungen, die nach ihrer Herstellung bei 25° je auf 35 und 60° erhitzt worden waren und im abgekühlten Zustande zur Messung gelangten. An diesen Lösungen wurde der Depolarisationsgrad gemessen. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle I und Abb. 2 wiedergegeben.

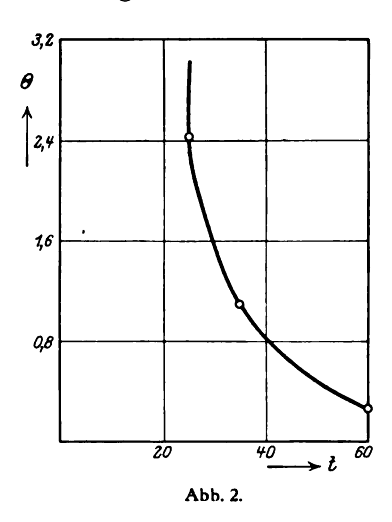


Abb. 2.

Tabelle I.

Gemessen bei $\lambda = 550\ \mu\mu$ (Uratkonzentration 0,006 mol/Liter).

Lösung	t	θ
A	25	2,426
B	35	1,112
C	60	0,246

Die bei 25° hergestellte Lösung *A* zeigt einen hohen Depolarisationsgrad, woraus folgt, daß es sich um ein „optisch trübes" Medium handelt. Dieses muß demnach *zweiphasig* sein, also Teilchen oberhalb einer gewissen Größe enthalten. Diese sind in bestimmter Menge vorhanden; außerdem zeigt sich Abweichung von der Kugelform, wie aus der starken Depolarisation folgt, — und wie dieses auch aus späteren Darlegungen noch hervorgehen wird. Es wird also eindeutig das Vorliegen eines kolloiden Systems angezeigt. Bei den auf höhere Temperaturen erhitzten Lösungen *B* und *C* nimmt der Depolarisationsgrad von *B* nach *C* hin bedeutend ab. Dieser Gang der Depolarisation ist in hohem Maße charakteristisch für das Verhalten von Natriumurat als Kolloidelektrolyt. Die Depolarisation zeigt nämlich an, daß bei Steigerung der Temperatur der *kolloide* Anteil auf Kosten des *molekularen* zurückgeht oder, schärfer gefaßt: das „Gleichgewicht" *Kolloid* $\rightleftharpoons$ *Elektrolyt* verschiebt sich bei Temperaturerhöhung nach der Seite *Elektrolyt*. In der Lösung, die bei 25° hergestellt worden war, ist also der kolloide Anteil am größten. Es sei hier schon vorgreifend erwähnt, daß durch die nachfolgenden Messungen dieses Verhalten des Urats auch weiterhin durchweg bestätigt wird.

Bei dieser Ursache der Abnahme des Depolarisationsgrades mit steigender Temperatur verringert sich naturgemäß stark die *Intensität* des Tyndallichtes *im ganzen*. Der Depolarisationsgrad würde zwar auch abnehmen, wenn die Teilchen*form* sich etwa wiederum der Kugelgestalt annäherte. Dieses ist aber auszuschließen, da eben zugleich die *Gesamtintensität* des Tyndallichtes abnimmt. In so starkem Maße ist dieses nur bei Teilchenverkleinerung möglich[1]). Aus der *Rayleigh*schen Strahlungstheorie folgt nämlich, daß die Intensität J des senkrecht zum einfallenden Strahle abgebeugten Lichtes beträgt:

$$J = \frac{9\,\pi^2\,\nu\,A^2\,v^2}{x^2\,\lambda^4}\left(\frac{n_1^2 - n^2}{n_1^2 + 2\,n^2}\right) \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad (2)$$

wo ν die Zahl der in der Volumeneinheit enthaltenen Teilchen ist, A die Amplitude des auffallenden Lichtes, v das Teilchenvolumen, λ die Wellenlänge des auffallenden Lichtes, x eine bestimmte Länge, n und n_1 sind die Brechungsexponenten von Dispersionsmittel und Teilchen. Die Intensität des abgebeugten Lichtes ist also dem Quadrat des Teilchenvolumens proportional. Daraus ergibt sich eben, daß die starke Abnahme der Intensität allein durch Verkleinerung der Teilchen bedingt sein kann.

---

[1]) Dabei ist naturgemäß vorausgesetzt, daß die Brechungsverhältnisse beider Phasen sich nicht ändern. Eine Annahme, zu der man wohl berechtigt ist.



Es muß hier aber noch ein anderer Umstand erwähnt werden, der sich ebenfalls aus dieser Strahlungsformel unmittelbar ergibt und von grundsätzlicher Bedeutung ist. Man sieht nämlich aus (2), daß es für die Teilchen*größe keine untere Grenze* gibt, bei der die Lichtabbeugung *aufhört.* Daraus folgt sofort, daß auch *Moleküle* dies tun werden, die Moleküle des Mediums sowohl wie auch darin gelöste. Allerdings wird sodann die Intensität J schwach sein, so gering, daß sie unter gewöhnlichen experimentellen Umständen nicht wahrgenommen zu werden vermag. Steigert man dagegen die Intensität der Beleuchtungsquelle in hinreichendem Maße, und sorgt man ferner für genügend große Unterschiede der Lichtbrechung, so würden selbst Moleküle von der genannten Art einen Tyndallkegel ergeben, wie dieses auch experimentell gezeigt worden ist. Versucht man doch, auf diese Weise sogar die Gestalt der Moleküle zu bestimmen. Für unsere gewöhnlichen experimentellen Bedingungen aber muß festgestellt werden, daß, obwohl ein Zusatzeffekt von seiten der Moleküle geliefert wird, er dennoch im Vergleich zu dem, der durch die disperse Phase hervorgerufen ist, von vielfach niederer Größenordnung, also in bezug auf unsere Messungen als verschwindend sich erweist.

Versuch 2.

(Einfluß der Alkalizugabe.)

In einer zweiten Versuchsreihe soll der Einfluß von Alkali auf den Zustand der wässerigen Natriumuratlösung untersucht werden. Die Lösungen wurden bei genauem Innehalten der Vorschriften, die *Freundlich* und *L. F. Loeb* angeben, aus Natriumurat durch Erhitzen auf dem Wasserbad bei 26° hergestellt. Vor der Messung standen die alkalisierten Lösungen jeweils 24 Stunden. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle II und Abb. 3 dargestellt.

Tabelle II.

Gemessen bei $\lambda = 550\ \mu\mu$ (Uratkonzentration 0,006 mol/Liter).

Lösung	n/10 NaOH ccm	Θ	Θ_0
1	0,0	1,429	
2	0,1	1,497	
3	0,2	1,949	0,675
4	0,3	1,380	
5	0,5	1,138	
6	0,7	0,432	0,216

In Abb. 3 ist als Abszisse der Zusatz von n/10 NaOH auf 10 ccm Lösung angegeben, als Ordinate die Depolarisation.

Das Ergebnis ist überraschend. Wie man erkennen kann, liegt bei einer Konzentration von 0,2 ccm n/10 NaOH ein Optimum der Kolloidbildung vor. Dieselben Messungen wurden an drei weiteren Lösungen wiederholt. Sie zeitigten alle dasselbe Ergebnis. Ursache für diese Erhöhung der Depolarisation kann eine Verringerung des Dispersitätsgrades der kolloiden Phase sein, oder eine Vermehrung der Teilchenzahl entsprechend den Bemerkungen, die oben im theoretischen Teil gemacht worden waren. Es war also nunmehr eine Entscheidung zu treffen, welche von beiden Möglichkeiten hier in Betracht kommt. Dieses gelingt durch Bestimmung der Depolarisation in zwei Konzentrationen.

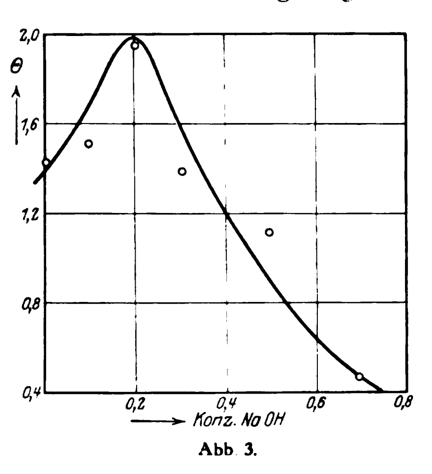


Abb. 3.

Bei den theoretischen Bemerkungen wurde bereits erwähnt, daß *R. Gans* zeigen konnte, daß die Depolarisation von der Konzentration abhängt. Er hat auch die mathematischen Beziehungen zwischen beiden Größen ermittelt. Hierfür ist in hohem Maße charakteristisch die Depolarisation Θ_0 eines einzelnen Teilchens. Θ_0 ist unabhängig von der Konzentration und zugleich ein direktes Maß für Teilchengröße und -form. Diese wichtige Größe nun läßt sich aus Depolarisationsmessungen bei zwei verschiedenen Konzentrationen berechnen. Es ist

$$\Theta_0 = \frac{a\,\Theta_2\,(1 + \frac{5}{3}\,\Theta_1) - \Theta_1\,(1 + \frac{5}{3}\,\Theta_2)}{a\,(1 + \frac{5}{3}\,\Theta_1) - (1 + \frac{5}{3}\,\Theta_2)} \quad \ldots\ldots\ldots (3)$$

wo $a = \frac{c_1}{c_2}$ ist.

Hierbei bedeuten c_1 die eine Konzentration, c_2 die andere, Θ_1 und Θ_2 die zu ihnen gehörigen Depolarisationen. Für Lösung Nr. 3 mit 0,2 ccm n/10 Alkali und für Lösung Nr. 6 mit 0,7 ccm n/10 Alkali wurde die Depolarisation in zwei Konzentrationen ermittelt und daraus die Depolarisation Θ_0 eines Einzelteilchens errechnet. Es ergibt sich, daß für Lösung Nr. 3 ein *Optimum hinsichtlich der Teilchengröße* vorliegt, da Θ_0 beträchtlich größer ist als bei Lösung Nr. 6[1]) (s. Tabelle II).

[1]) Muß hier auch zugegeben werden, daß bei Verdünnung der Lösung schon eine „Gleichgewichts“-verschiebung von Kolloid ⇄ Elektrolyt nach dem Elektrolyt hin eintreten wird, so liegt andererseits die Annahme nahe, daß bei den sehr geringen, hier vorliegenden Verdünnungen (5 : 6) dieser Fehler gering zu achten ist. Die Berechtigung zu dieser Vernachlässigung ergibt sich aus der im Abschnitt IV ermittelten molekularen Löslichkeit.

Vorausgreifend sei hier gleich bemerkt, daß sich aus den quantitativen Feststellungen bei der Dunkelfelduntersuchung ergeben wird, daß bei dieser Lösung zugleich auch eine Vermehrung der Teilchen*zahl* vorliegt, wodurch sich die obige Annahme rechtfertigt, daß hier ein Optimum der Kolloidbildung besteht.

III. Dunkelfeldbetrachtung.

Aus dem Vorstehenden wird sofort die Frage hervorgehen, ob nicht der besondere *kolloide* Zustand der vorliegenden Uratlösung auch bei ihrer Betrachtung im Dunkelfeld sich nachweisen läßt. Dazu ist grundsätzlich zu bemerken, daß dieses *nicht* erforderlich ist. Polarisiertes Tyndallicht wird *vorzugsweise* ausgestrahlt von zweiphasigen Systemen, bei denen die Durchmesser der Teilchen der dispersen Phase im Größenbereich von etwa $5 \cdot 10^{-7}$ bis $5 \cdot 10^{-6}$ cm liegen. Diese Teilchen sind daher *amikronisch* und lassen sich nicht im Dunkelfeld erkennen, sondern hellen nur den Untergrund schwach auf. In unserem Falle dagegen glückt es, bei der Betrachtung der reinen Uratlösung im Kardioiddunkelfeld diese Lösung einwandfrei als Sol zu erkennen. Man sieht nicht allzu kleine, mäßig lichtstarke Aggregate in *Brown*scher Bewegung. Diese Aggregate zeigen gegen das Dispersionsmittel nicht so starke Differenzen in der Lichtbrechung wie ein ausgesprochen hydrophobes Sol, — etwa ein Metallsol —, dagegen bestehen aber doch stärkere, solche Unterschiede, als sie etwa ein Lecithinsol gegen sein Dispersionsmittel aufweist. Damit sei der Grad der Hydrophilie des Natriumuratsols annähernd charakterisiert. Weiterhin zeigt sich hier als besondere Eigenheit der dispersen Phase, daß sie nicht aus kugeligen Teilchen besteht, sondern daß längliche, — etwa längliche Plättchen, — vorliegen. Damit erklärt sich das zuweilen unter günstigen Umständen wahrnehmbare *Funkeln* des Uratsols. Auch das bisweilen bemerkbare ausgesprochene *Schlieren* der Uratlösungen findet in der anisodiametrischen Teilchenform seinen Grund. Abb. 4 gibt die Dunkelfeldaufnahme der reinen Uratlösung, so wie sie von uns verwendet wurde. Durch sie wird ebenfalls objektiv der Solcharakter des vorliegenden Systems erwiesen.

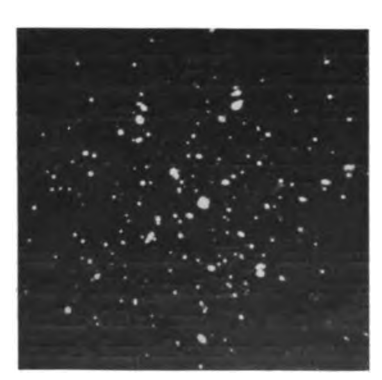


Abb. 4.

Variiert man nun die Zustandsbedingungen für die Uratlösung durch Zusatz von Alkali in der Weise, wie dieses oben mitgeteilt wurde,

so zeigt sich bei der Dunkelfeldbetrachtung unter *allseitiger* Beleuchtung eine Änderung des „Bildes", die genau dem oben beschriebenen Kurvenverlauf bei der Depolarisationsmessung entspricht. Bis zum Zusatz von 0,2 ccm Na(OH) auf 10 ccm Sol nimmt die Teilchen*zahl* in leicht erkennbarer Weise zu. Die Zunahme der Teilchen*größe* ist bei dieser Betrachtungsart nicht zu erkennen, was ja auch nach der Natur der „Abbildung" im Dunkelfeld nicht zu erwarten ist, was aber bei einer anders gearteten Untersuchung, von der oben die Rede gewesen war, sich herausgestellt hatte. Auch eine photographische Wiedergabe der Teilchen*vermehrung* ist technisch äußerst schwierig, weswegen wir auf sie hier verzichten. Sie ergibt sich weit einfacher auf eine gleich zu erwähnende Weise. Geht man in der Alkalizugabe weiter, so nimmt die Teilchenzahl wieder ab. Damit ist die Übereinstimmung mit den Depolarisationsmessungen sichergestellt.

Die hier soeben *qualitativ* dargelegten Erscheinungen bei Betrachtung im Dunkelfeld unter *allseitiger* Beleuchtung sind aber einer *quantitativen* Auswertung zugänglich, sobald man zu *einseitiger* Beleuchtung übergeht. Zu diesem Zwecke wurde das *Zsigmondy*sche Immersionsultramikroskop herangezogen. Mit diesem wurde die Auszählung der Teilchen in der üblichen Weise vorgenommen. Das Ergebnis ist in der Tabelle III zusammengefaßt.

Tabelle III.

Zählvolumen 308 μ^3. Mittel aus 300 Zählungen.

Lösung	n/10 NaOH ccm	1. Tropfen	2. Tropfen	3. Tropfen	Mittel
1	0,0	4,12	3,21	3,37	3,27
2	0,1	(3,55)	3,29	3,42	3,42
5	0,5	1,81	1,71	1,82	1,78
6	0,7	0,666	0,688	0,645	0,665

Aus ihr geht zunächst die Bestätigung der Befunde bei der Depolarisationsmessung hervor. Die reine Uratlösung (Lösung Nr. 1) weist eine bestimmte Zahl von Aggregaten auf, die sich in *Brown*scher Bewegung befinden. Dadurch ist ihr kolloider Charakter bewiesen. Bei Alkalizusatz nimmt dieser kolloide Anteil bis zur Zugabe von 0,2 ccm n/10 NaOH (Lösung Nr. 2) zu, um dann bei weiter steigender Alkalität wieder abzu-

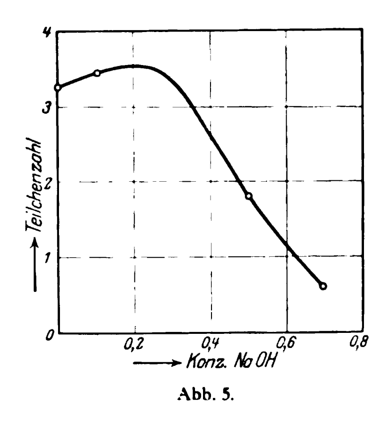


Abb. 5.

nehmen. Damit ist aber nunmehr für das qualitative Ergebnis im Kardioiddunkelfeld die exakt quantitative Bestätigung gefunden.

Wir geben schließlich noch drei Abbildungen des Tyndallkegels, wie er sich im Immersionsultramikroskop darbietet.



Abb. 6.



Abb. 7.

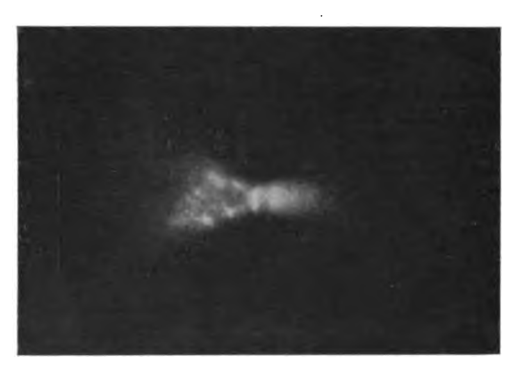


Abb. 8.

Abb. 6 zeigt die reine Natriumuratlösung, Abb. 7 dieselbe unter Zusatz von 0,1 ccm NaOH, Abb. 8 diejenige von 0,7 ccm NaOH-Zusatz. Es läßt somit also auch die Dunkelfeldbetrachtung *keinen Raum* für eine *andere* Auffassung des Zustandes der hier verwendeten Natriumuratlösung als für die des Vorliegens eines typisch zweiphasigen, kolloiden Systems.

Es muß an dieser Stelle noch aufmerksam gemacht werden auf einen Befund, den *R. Stern* (l. c.) als „einmaliges Zufallsprodukt“

bei seinen Untersuchungen über das Verhalten der Urate mitteilte. Er konnte bereits gewisse Teile der oben beschriebenen Ergebnisse unserer Dunkelfeldbeobachtungen an einer Uratlösung feststellen. So fand auch er das Schlieren, die nichtkugeligen Teilchen und das Funkeln. Weitergehende Untersuchungen konnte er leider nicht anstellen, da er sein Sol nicht reproduzieren konnte. So blieb sein damaliger, von uns nunmehr endgültig bestätigter Befund eine Singularität, wie *Stern* in seiner Arbeit selbst bemerkt. Wir konnten dagegen mit der auf unsere Weise hergestellten Uratlösung unsere Befunde stets reproduzieren.

Im übrigen muß erwähnt werden, daß vorher schon *H. Schade* (l. c.) bei seinen Uratlösungen auf das Vorliegen des Tyndallichtes hingewiesen hatte. Allerdings ist er nicht tiefer in die Analyse dieses Phänomens eingedrungen, was zu seiner Zeit auch noch nicht möglich war.

Es war nunmehr naheliegend, eine Bestimmung der absoluten Teilchengröße anzustreben, da die Zählung im Ultramikroskop mit erheblicher Genauigkeit vorgenommen werden konnte. Bezüglich der absoluten Genauigkeit derartiger Messungen sei in rein physikalischer Beziehung hier erwähnt, daß es sich naütrlich nur um die Bestimmung einer *mittleren* Größe handeln kann; denn es ist wohl hinreichend bekannt, daß alle kolloiden Systeme in weitgehendem Maße polydispers sind, unter Vorwiegen einer bestimmten mittleren Größe. Ferner werden zur weiteren Berechnung gewisse vereinfachende Annahmen notwendig, die vor allem die Teilchenform betreffen. Nimmt man den physikalisch einfachsten Fall der Würfelform an, so bestimmt sich der Teilchendurchmesser b zu

$$b = \sqrt[3]{\frac{v \cdot c}{s \cdot n}} \quad \ldots \ldots \ldots \ldots \quad (4)$$

Hierin bedeutet v das Zählvolumen, c die Konzentration der kolloiden Phase, s das spezifische Gewicht und n die mittlere Teilchenzahl im Zählvolumen.

Da das spezifische Gewicht von Natriumurat aus der Literatur nicht zu ermitteln war, wurde es von uns bestimmt nach der Pyknometermethode als in Alkohol aufgeschwemmtes Pulver. Es ergab sich zu 2,356 bei 20°.

Weiterhin mußte die Konzentration der kolloiden Phase ermittelt werden. Es wurde zuerst versucht, den kolloiden Anteil durch Zentrifugieren bei 5000 Touren zu entfernen. Es gelang jedoch selbst bei sehr langem Zentrifugieren nicht, zu klaren Lösungen zu kommen. Dieses Ziel wurde dann durch *Ultrafiltration* erreicht. Wir benutzten den Ultrafiltrationsapparat nach *Zsigmondy* mit Membranfiltern von solcher Porengröße, daß 20 ccm Natriumurat in 2 Stunden filtriert

wurden. Im Filtrat und in der Ausgangslösung wurde nach der Mikrokjeldahlmethode die Natriumuratkonzentration bestimmt und hieraus die Löslichkeit und Konzentration der kolloiden Phase errechnet.

Bei 20° ergab sich eine Löslichkeit von 0,683 g Natriumurat im Liter bei einer Gesamtkonzentration von kolloidem und molekularem Anteil von 1,076 g Natriumurat pro Liter. Es beträgt demnach der kolloide Anteil bei dieser Konzentration (in 0,005 mol/Liter) etwa 40 Proz.

Dieser Methode der Konzentrationsbestimmung des kolloiden Anteils könnte noch der Einwand gemacht werden, daß ein beträchtlicher Anteil in sehr feiner Verteilung mit in das Ultrafiltrat gelangen könne und so eine erheblich größere Löslichkeit vortäuschen. Es ist daher erforderlich, auf einem unabhängigen, anderen Wege dieses Ergebnis zu prüfen. Dafür erwies sich die Lichtabsorption als geeignet. Die molekulare Lösung von Natriumurat zeigt für die grüne Quecksilberlinie $\lambda = 546{,}07$ keine Absorption. Erst bei Gegenwart von Kolloidteilchen tritt eine solche auf, die durch Streuung hervorgerufen ist. Es wird nunmehr die Lichtabsorption als Funktion der Konzentration bestimmt und damit der Punkt ermittelt, für den die Absorption Null wird, d. h. alles molekular gelöst ist. Das Ergebnis ist in Tabelle IV sowie Abb. 9 wiedergegeben.

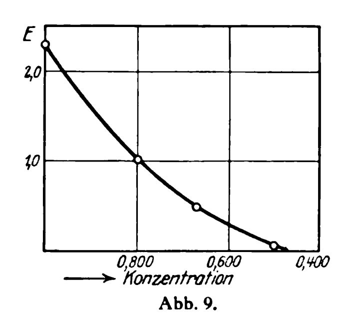


Abb. 9.

Tabelle IV.

Photometriert bei $\lambda = 546{,}07$.

Konzentration	$E = \log \frac{J_0}{J}$
1,00	2,315
0,80	1,032
0,666	0,511
0,500	0,058

In Abb. 9 ist auf der Abszisse die Konzentration des Urats in Gramm pro Liter und auf der Ordinate die Lichtextinktion aufgetragen. Hiernach bestimmt sich die Löslichkeit zu 0,51 g Natriumurat im Liter. Es ergibt sich also auf diesem Wege eine geringere Löslichkeit. Bei der Ultrafiltration ist eben ein gewisser kleiner Anteil noch kolloid hindurchgegangen. Er liegt in amikronischer Form vor, wovon die optische Homogenität der Lösung bei ganz schwacher Aufhellung des Dunkelfeldes im Immersionsultramikroskop Zeugnis ablegt. Daraus ergibt sich also, daß in der Natriumuratlösung *Submikronen, Amikronen* und *Ionen* vorhanden sein müssen.

Nach Bestimmung der Löslichkeit waren alle Daten für eine *Berechnung der Teilchengröße* vorhanden. Sie ergibt für den Durchmesser einen Wert von 2,3 . 10^{-5} cm. Damit ist ein Wert für die Teilchengröße gefunden, der tatsächlich in dem Bereich liegt, der für die kolloiden Systeme vorzugsweise charakteristisch ist.

Ergebnis.

Gegenüber der Annahme einer Reihe von Autoren, daß die gelösten Urate in größerer oder geringerer Menge kolloide Bestandteile von Natriumurat enthalten, und gegenüber der weitergehenden Folgerung von *Freundlich* und *Loeb*, daß das Natriumurat ein Kolloidelektrolyt im Sinne *McBains* sei, bringt die vorstehende Arbeit auf mehreren, voneinander unabhängigen Wegen den *direkten Beweis* von der Zweiphasigkeit, von dem kolloiden Zustande, der reinen Uratlösung. Die Verwendung der Messung des Verhältnisses von natürlicher zu polarisierter Lichtmenge (Depolarisation), die seitlich ausgestrahlt wird (Faraday-Tyndallicht), sowie die Anwendung weiterer quantitativer Methoden (Zählung usw.) ermöglichen es dagegen, über die rein qualitative Feststellung des Vorliegens eines kolloiden Systems hinauszugehen. Es können nunmehr bereits exakte, quantitative Aussagen über physikalische Konstanten des Uratsols gemacht werden. So konnte für eine *bestimmte* Uratkonzentration festgestellt werden, mit welchem Prozentsatz echt gelöster Anteil hier im „Gleichgewicht" steht mit dem kolloiden. Es konnte ferner Teilchenzahl und Teilchengröße ermittelt werden.

Einen *weiteren* Einblick in den Charakter des Natriumuratsols gab aber sein Verhalten gegenüber *Variierung der Zustandsbedingungen* durch Zusatz von Alkali und Erhitzen. Dabei ergab sich durch direkte Messungen, daß bei wachsendem Alkalizusatz zunächst Teilchenzahl und Teilchengröße zunehmen, um bei noch weitergehender Alkalisierung sich dem Zustande echter, molekulardisperser Lösungen zu nähern. Damit ist weiterhin bewiesen, daß *eine einzige* Natriumuratlösung sowohl zu einem wesentlichen Teil in *typisch kolloider* Form vorliegen, daß aber *dieselbe* Konzentration, sobald man nur ihre *Zustandsbedingungen* ändert, in *echt* gelöster Form erscheinen kann. Darin erweist sich also wiederum der *Elektrolytcharakter* der Natriumuratlösungen. Die Erwärmung liefert analoge Ergebnisse.

Auf diese Weise beantwortet sich nunmehr von selbst eine Frage, die sich gewiß an mehreren Stellen der Arbeit schon erhoben hat, die Frage, welchem Umstand es zugeschrieben werden muß, daß *die eine* Reihe von Forschern stets zu *echt gelösten* Uratsystemen gelangte, während *die andere* Reihe nur *kolloide* vorfand. Die Messungen (Tabellen I, II und III, Abb. 2, 3 und 5) zeigen aufs deutlichste, daß

schon geringe Abweichungen von jenen oben genannten Größen einen starken Einfluß auf den Zustand der Uratlösungen ausüben werden. Läßt sich doch aus den Kurven ablesen und somit voraussagen, was geschehen würde, falls man z. B. die *Reaktion* oder die *thermische Vorbehandlung* anders wählen würde. So erkennt man aus Tabelle I und Abb. 2, daß Lösungen, die oberhalb 25° hergestellt oder nachträglich auf höhere Temperatur gebracht worden sind, viel weniger Anhaltspunkte für kolloiden Charakter liefern werden als solche, die bei 25° hergestellt sind. Aus Tabelle II und Abb. 3 wiederum geht hervor, daß eine *bestimmte Alkalität* im Medium die Gewähr für *ausgeprägtest kolloiden* Charakter bietet, daß aber auch nur *geringe* Abweichungen von dieser Reaktion den anderen möglichen Zustand, den *Elektrolytzustand*, begünstigen werden.

Im Anschluß an die dargelegten Ergebnisse seien schließlich noch einige prinzipielle Bemerkungen gestattet. In seiner Zusammenfassung über den Stand des Uratproblems schreibt *Höber* (11): „*Es ist also wohl kaum zu bezweifeln, daß das Natriumurat, wenn es in übersättigter Lösung vorhanden war, bei seinem Ausfall ein kolloides Stadium durchlaufen kann.*“ Weiterhin bemerkt er: „Es lassen sich also Stadien in den übersättigten Lösungen finden, während deren das Urat teilweise in kolloider Form vorhanden ist.“

Demgegenüber zeigen unsere Untersuchungen einwandfrei, daß für Auftreten des kolloiden Zustandes das Überschreiten des „Sättigungspunktes“ *nicht* notwendig ist. Die genaue Bestimmung der molekularen Löslichkeit mit Hilfe der Lichtabsorption ergab bei 20° eine Löslichkeit von etwa 0,51 g Natriumurat im Liter. Das ist erst etwa die Hälfte derjenigen Menge, die als „Sättigungskonzentration“ gilt. Diese beträgt, allerdings für 37°, 1,3 g im Liter[1]). Sodann aber ist nach den vorliegenden experimentellen wie auch theoretischen Ergebnissen zu bezweifeln, ob den bisher angewendeten Begriffen von „Sättigung“ und „Übersättigung“ hier überhaupt noch ein exakter Sinn zugeordnet werden kann. Eine echte Lösung, deren Sättigungspunkt überschritten ist, kristallisiert aus oder befindet sich in *echter* übersättigter Lösung. Diesem definierten Zustande steht beim Natriumurat, — überhaupt bei den Kolloidelektrolyten, — folgender Befund gegenüber. Von einer bestimmten Konzentration ab[2]) treten Ultramikronen auf, deren Zahl bei weiterer Konzentrationssteigerung zunimmt. Es könnte hier

[1]) Es ist hierbei darauf zu verweisen, daß nach Abb. 2 die Depolarisation bei 37° gerade 1 ist, also der kolloide Anteil immer noch recht beträchtlich. Wenn also auch bei 37° die molekulare Löslichkeit größer sein wird als 0,51 g/Liter, so wird sie sicher von 1,3 g noch recht entfernt sein.

[2]) Diese stimmt mit jener „Sättigungskonzentration“ nicht überein!

wohl eingewandt werden, daß eben dieser kolloide Anteil den ausgefallenen Kristallen entspricht. Dem ist aber entgegenzuhalten, daß der kolloide Anteil *stabil* ist, daß eine *bestimmte mittlere Teilchengröße* vorliegt, die nicht weiter überschritten wird, und daß diese Teilchen die *Brown*sche Bewegung zeigen. Es müssen also in diesem Falle den Kristallisationskräften, der Molekularattraktion, hier solche Kräfte entgegentreten, die jener Molekularattraktion schließlich das Gleichgewicht halten, also bewirken, daß ein weiteres Wachstum der Teilchen von einer bestimmten Größe ab unterbleibt. Dieses sind aber für gewöhnlich die Kräfte der elektrischen Doppelschicht an submikroskopischen Phasengrenzen. Sie wirken weitgehend in Richtung der Vergrößerung der Gesamtoberfläche. Alles dieses ist aber wiederum charakteristisch allein für *kolloide Systeme.* Man hat es also mit einem Gesamtvorgang zu tun, der mit der einfachen Kristallisation nicht zusammenfällt. Aus alledem ergibt sich demnach, daß man für neutrale wässerige Uratlösungen den Vorstellungskomplex von „Sättigung" und „Übersättigung", der bei echten Lösungen wohl definiert ist, hier nicht anwenden sollte, so wenig wie man dieses bei den Seifenlösungen oder dem Vanadinpentoxydsol tut.

Zusammenfassung.

Die vorstehende Arbeit bringt:

1. den *direkten* Beweis für den Kolloidelektrolytcharakter der Natriumuratlösungen;

2. darüber hinaus *quantitative* Angaben über bestimmte physikalische Parameter des Uratsols.

Zu 1. Der Beweis des Vorliegens eines Uratsols ergibt sich aus:

a) der *Existenz* einer erheblichen *Depolarisation*;

b) dem *Dunkelfeldbild* bei *all*seitiger sowie auch *einseitiger* Beleuchtung;

c) dem Verhalten gegen *Ultrafiltration.*

Zu 2. Die quantitativen Aussagen erstrecken sich auf:

a) die Angabe, mit welchem *Prozentsatz* bei *bestimmter* Konzentration *kolloider* Anteil im Gleichgewicht steht mit *echt gelöstem*;

b) die Teilchen*zahl*, die Teilchen*form* und Teilchen*größe* bei einer *bestimmten* Konzentration;

c) den Sinn, in dem dieser Kolloidelektrolyt seinen Zustand ändert, sobald man gewisse Zustandsgrößen variiert, wie

α) die Reaktion des Milieus,

β) die Temperatur, der die Lösung nach ihrer Anfertigung unterlag.

Literatur.

1) *Lichtwitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **64**, 144, 1910; **84**, 416, 1913. — 2) *Gudzent*, ebendaselbst **60**, 25, 1909; **56**, 150, 1910. — 3) *Kohler*, Zeitschr. f. klin. Med. **78**, 1, 1913; **87**, 190, 1919; Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **17**, 473, 1919. — 4) *Schade* und *Boden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **83**, 347, 1913; *Schade*, Verh. XXXI. Kongr. f. inn. Med. 1914; Zeitschr. f. klin. Med. **98**, 1, 1922. — 5) *Bechhold* und *Ziegler*, diese Zeitschr. **20**, 183, 1909; **24**, 146 1910; **64**, 471, 1914. — 6) *R. Stern*, ebendaselbst **150**, 535, 1924. — 7) *Freundlich* und *L. Farmer Loeb*, ebendaselbst **180**, 141, 1927. — 8) *G. Mie*, Ann. d. Phys. **25**, 377, 1908. — 9) *R. Gans*, ebendaselbst **37**, 881, 1912; **47**, 270, 1915; **62**, 331, 1926; Zeitschr. f. Phys. **17**, 353, 1923; **29**, 231, 1924. — 10) *Br. Lange*, erscheint demnächst in Zeitschrift für Physik. — 11) *R. Höber*, Physikal. Chem. d. Zelle u. der Gewebe, VI. Aufl., 1926, S. 61 bis 67.

Studien über Fett- und Lipoidstoffwechsel.

I. Mitteilung:

Über alimentäre Lipämie. Die Beziehungen zwischen Neutralfett und Lipoiden in der Norm und bei Belastung mit Neutralfett bzw. Oleinsäure.

Von

Samuel Leites.

[Aus dem Laboratorium für pathologische Physiologie des Medizinischen Instituts zu Charkow (Ukraine.)]

(Eingegangen am 9. Februar 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

1. Einleitung.

Die Fette und Lipoide, die durch einige ihrer allgemeinen chemischen und physikalischen Eigenschaften in eine Gruppe vereinigt sind, unterscheiden sich bedeutend voneinander nach der physiologischen Rolle, welche sie im Organismus spielen.

Fette — Triglyceride — dienen dem Organismus hauptsächlich als Brennmaterial; ihre Bedeutung in der Ökonomie des Organismus wird durch ihren Kalorienwert bestimmt; aber die Rolle der Lipoide — Sterine und Phosphatide — geht weit über die Grenze ihrer Kalorienwertbedeutung hinaus und wird in bedeutendem Grade durch ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften bedingt. Da die Lipoide schwache Oberflächenspannung besitzen, konzentrieren sie sich hauptsächlich in den äußeren Zellschichten, und indem sie die Rolle der Regulatoren des Wassers und Ionenaustausches in der Zelle spielen (*Brinkman* und *v. Dam*, *Meyer* und *Schäffer*), erscheinen sie als einer der Hauptfaktoren, welche die Zellpermeabilität und eo ipso ihre Ernährung und ihre dynamischen Eigenschaften bestimmen. Wenn man hinzufügt, daß Lipoide als Aktivatoren der Fermente dienen (*Arrhenius*, *Sachs*, *Landsteiner* und *Jagić*), ferner, daß sie große Bedeutung für die synthetischen Prozesse des Organismus (*B. Danilewsky*) und für die Immunitätserscheinungen (*H. Much*) besitzen, so wird die äußerst wichtige aktive Rolle der Lipoide in der Dynamik der physiologischen Prozesse außer Zweifel stehen.

Infolgedessen ist es dringend notwendig, das Schicksal der Lipoide im Organismus aufzuklären, einzelne Etappen ihres Stoffwechsels, den Mechanismus ihrer Metabolie usw. Diese Fragen bieten besonderes Interesse für die pathologische Physiologie, sofern der Störung des

Lipoidstoffwechsels einerseits die Pathogenese einer Reihe von Erkrankungen zugrunde liegt, und die Veränderung andererseits als Folge gewisser pathologischer Zustände (Diabetes, Nephrose, Splenomegalie und anderer) erscheint.

In dem Stoffwechsel, der in dem komplizierten, vielzelligen Organismus stattfindet, kann man zwei Arten eng miteinander verbundener Prozesse unterscheiden; die Prozesse der Bildung, der Umwandlungen und des Zerfalls des Stoffes in die bestimmten Zellelemente und durch die spezifische Funktion der letzteren einen bestimmten, sogenannten inneren, zelligen intermediären Stoffwechsel; einzelne Etappen, verschiedene Phasen dieser Prozesse, sind im differenzierten Organismus mit verschiedenen, zelligen Aggregaten verbunden. Die Übergänge einer Etappe des inneren Stoffwechsels in eine andere, welche von bestimmten korrelativen Wechselbeziehungen zwischen den zelligen Komplexen abhängig sind, bilden die zweite Gruppe der Prozesse des Stoffwechsels; die regulatorischen Apparate des Organismus — endokrines System und vegetatives Nervensystem — spielen eine dominierende Rolle in dem Mechanismus dieser zweiten Gruppe der Prozesse. Was den inneren intermediären Stoffwechsel betrifft, so zeigt eine Reihe von Angaben (*Metschnikoff, Ranvier, Goldmann, Aschoff, Carrel, Bogomoletz*) eine Verbindung des letzteren mit der Funktion des Mesenchyms, nämlich mit jenen ihrer aktiven Elemente, welche durch *Metschnikoff* in dem Begriff der makrophagischen Elemente vereinigt waren und durch *Aschoff* und seine Schule in dem sogenannten reticuloendothelialen Apparat hervorgehoben sind.

Von diesem Standpunkt aus kann sich die Erforschung des Fett- und Lipoidstoffwechsels in zwei Richtungen entwickeln; einerseits die Erforschung einzelner Etappen des Schicksals der Fette und Lipoide im Organismus, der Wege ihrer Bildung, der verschiedenen Stadien ihrer Umwandlungen und des Zerfalls, und andererseits die Aufklärung der Wechselbeziehungen zwischen einzelnen Phasen des intermediären Stoffwechsels, der Rolle der regulatorischen Apparate in ihrer Korrelation. Es ist selbstverständlich, daß das erste dem zweiten vorangehen sollte, um so mehr, als die Frage nach der Metabolie der Fette und besonders der Lipoide, über den Ort ihrer Synthese und den Zerfall, über den Charakter ihrer Umwandlungen als eine in der Physiologie am wenigsten aufgeklärte erscheint. Abgesehen von der verschiedenen physiologischen Bedeutung, welche die Fette und Lipoide haben, besteht zwischen ihnen im Organismus eine innige Verbindung, eine bestimmte Wechselwirkung, die dadurch zum Ausdruck kommt, daß, wie die klinischen und experimentellen Beobachtungen zeigen (*Klemperer* und *Umber, Bürger, Feigl, Bloor, Knudson, Wacker* und *Hueck, Schaeffer, Reicher, Sakai* u. a.), die quantitative Veränderung der Fette im Blute immer von Veränderungen des Cholesterins und der Phosphatide begleitet wird, und umgekehrt, die Zunahme oder die Abnahme der letzteren im Blute die Veränderungen der Triglyceride zur Folge hat. Dieser Umstand läßt a priori vermuten, daß die Metabolie der Fette einerseits und Lipoide andererseits innig verbunden sind und eben dadurch Veranlassung gibt, die Prozesse des intermediären Stoffwechsels der Fette und Lipoide unter diesem Standpunkt zu erforschen. Eine andere Frage, welche sich bei einem Studium des Stoffwechsels der Fette und Lipoide einstellt, ist die Klärung der zelligen Komplexe bzw. Organe, in welchen dieser Stoffwechsel vor sich geht, und die Klarlegung ihrer Funktion in dieser Beziehung.

Eine Reihe experimenteller Arbeiten, welche dieser Frage gewidmet sind (*Landau*, *Rothschild*, *Soper*, *Eppinger*, *Embden*, *Artom*, *Chauffard*, *Grigaut*, *Roger* und *Binet*, *Abelous* und *Soula*, *Marino*, *Lombroso* u. a.), verbinden die Prozesse der Fett-Lipoidmetabolie mit der Funktion der Milz, Leber, Nebenniere und Lunge. Andererseits zeigen die morphologischen Untersuchungen (*N. N. Anitschkow*, *Chalatow*, *Wacker* und *Hueck*, *Versé*, *M. B. Schmidt*, *Zinserling*, *Klinge* und *Wacker*, *W. H. Schultze*, *Lutz*, *Kawamura*, *Kusunoki*, *Oppenheimer*), daß chronische Lipämien und Lipoidämien – experimentelle und klinische — von den Ablagerungen der Lipoide in Reticuloendothelien der Milz, Leber, Nebennierenrinde und des Knochenmarks begleitet werden, und heben mit denselben die Frage über das reticulo-endotheliale System, als Apparat des intermediären Stoffwechsels der Fette und Lipoide, hervor.

Die experimentellen und morphologischen Angaben, welche als Vorbedingung für unsere Forschungen erscheinen, lassen folgende dabei entstehenden Probleme offen und ungelöst:

1. Ob der physiologische Prozeß der Elimination der Fette und Lipoide aus dem Blute in den Organen mit entwickeltem Reticuloendothel und besonders in der Milz, diesem reticulo-endothelialen Organ par excellence, vor sich geht.

2. Ob Leber, Milz, Lunge, Nebenniere die Wechselbeziehungen zwischen Fetten und Lipoiden bestimmen und in welcher Richtung.

3. Ob neben den Prozessen der Elimination der Fette und Lipoide aus dem Blute die Prozesse der Umwandlungen, Verarbeitung, Metabolie der resorbierten Stoffe in diesen Organen Platz haben, und inwiefern dies mit der Funktion der reticulo-endothelialen Elemente verbunden ist.

Die Aufklärung dieser Fragen haben wir als Aufgabe unserer Untersuchungen gestellt, die in folgenden Richtungen hin unternommen sind:

a) Die Untersuchung des Bildes und des Verlaufs der alimentären Lipämie bei der Einführung per os Ol. olivarum und Acidum oleinicum.

b) Die Untersuchungen des Bildes und des Verlaufs der alimentären Lipoidämie bei der Einführung per os des Cholesterins im Olivenöl und des Lecithins.

c) Dasselbe wie bei a) und b) aber bei „Blockade“ des reticulo-endothelialen Systems mittels Collargol und Tusche.

d) Dasselbe wie bei a) und b), aber nach der Splenektomie und Splenektomie + „Blockade“.

e) Die Erforschung der Rolle der Lungen im Fett- und Lipoidstoffwechsel in der Norm, nach „Blockade“ und Splenektomie.

f) Die Erforschung der Rolle der Reticuloendothelien der Leber und Milz in dem Mechanismus der Bildung des Cholesterins der Galle.

Als Versuchstiere dienten Hunde. Das Blut, das periphere als auch das arterielle und venöse, welches von den inneren Organen abströmte, wurde auf den Gehalt an Neutralfett, freiem Cholesterin, gebundenem Cholesterin, auf die sogenannte Phosphatidfraktion (Phosphatide + Seifen) nach *Bang* und auf lipoiden Phosphor hin untersucht.

2. Methodik.

Eine der Ursachen, welche die Erforschung der Fett-Lipoidmetabolie erschwerten, sind die methodologischen Schwierigkeiten in der Bestimmung der Fette und Lipoide und ihre Einteilung. Wenn in bezug auf Fette (Triglyceride) die Erforschung des Gaswechsels als Methode gilt, welche über die Schlußphase ihres Stoffwechsels, ihrer Verbrennung und in bestimmten Grenzen über ihre Umwandlungen zu urteilen erlaubt, so kann man dasselbe in bezug auf Sterine und Phosphatide, deren Kalorienwert in dem Organismus gering ist, nicht sagen; die morphologische Methode der Erforschung der Fette und Lipoide, welche die quantitativen Wechselbeziehungen (*Kutschera-Aichbergen, Hammar, Versé*) nicht zeigt, erscheint auch als ungenügende, und nur die chemische Bestimmung der Fette und Lipoide im Blute und in den Organen erscheint als Methode, welche die Möglichkeit gibt, über die Dynamik der Metabolie dieser Stoffe zu urteilen.

Auf den Vorbedingungen basierend, welche in der Einleitung erwähnt sind, verlangte das Anstellen unserer Versuche erstens Serien-Untersuchungen und zweitens gleichzeitige Bestimmung des Neutralfettes, des Cholesterins, der Phosphatide und Fettsäuren. Von diesem Standpunkt ausgehend, mußten wir allen bestehenden Methoden der Bestimmung der Fette und Lipoide die Methode *Bang* vorziehen, weil dieselbe eine unbedeutende Blutmenge verlangt, was als großer Vorteil bei Serien-Untersuchungen erscheint, und andererseits — und dies hatte für uns eine besondere Bedeutung — gibt sie die Möglichkeit, gleichzeitig das Neutralfett und einzelne Lipoidfraktionen im Blute zu bestimmen. Wie bekannt, geht nach *Bang* das Neutralfett und freies Cholesterin in den Petrolätherauszug — gebundenes Cholesterin, Phosphatide und Seifen — in den Alkoholauszug über.

Die von uns in dieser Beziehung angestellten Kontrollversuche stimmen vollständig mit den Angaben *Bangs* überein. Wir konnten uns überzeugen, 1. daß das freie Cholesterin, wenn man ein Löschpapierstreifchen mit ausgetrocknetem Blute (80 bis 130 mg) in der Kälte mit Petroläther behandelt, innerhalb 2 Stunden gänzlich in den Auszug übergeht und die Cholesterinester und Phosphatide (bzw. lipoider P) nicht übergehen, und 2. daß Cholesterinester und Phosphatide völlig in den Alkoholextrakt (in der Kälte innerhalb 24 Stunden) übergehen. Ich führe zwei Beispiele an:

Hund 3. Aus der Vene des Ohres sind 12 ccm Blut entnommen worden. Bestimmung nach *Bang*: Petrolätherfraktion 0,104 Proz.; Neutralfett 0,053 Proz.; freies Cholesterin 0,051 Proz.; Alkoholfraktion 0,280 Proz.; gebundenes Cholesterin 0,052 Proz.; „Phosphatide“ 0,279 Proz.; lipoider P im Alkoholauszug nach *Briggs* 10 mg-Proz.

Bestimmung nach *Windaus*: Freies Cholesterin 0,0503 Proz.; gebundenes Cholesterin 0,0535 Proz.

Bestimmung nach *Briggs*: Lipoider P 9,72 mg-Proz.

Hund 5. Aus der Vene des Ohres sind 15 ccm Blut entnommen worden. Bestimmung nach *Bang*: Petrolätherfraktion 0,137 Proz.; Neutralfett 0,047 Proz.; freies Cholesterin 0,090 Proz.; Alkoholfraktion 0,220 Proz.; gebundenes Cholesterin 0,062 Proz.; „Phosphatide" 0,165 Proz.; lipoider P im Alkoholauszug (nach *Briggs*) 6,67 mg-Proz.

Bestimmung nach *Windaus*: Freies Cholesterin 0,0821 Proz.; gebundenes Cholesterin 0,0644 Proz.

Bestimmung nach *Briggs*: Lipoider P = 7,00 mg-Proz.

Wie aus diesen Angaben ersichtlich ist, gibt die *Bang*sche Methode gute Resultate in bezug auf die Bestimmung der absoluten Zahlen des Cholesteringehalts im Blute. Was die Exaktheit der Methode *Bangs* betrifft, so bemerken einige Autoren (*Maas, Forster, Bing* und *Heckscher*) große Schwankungen, bedeutenden Fehlerprozentsatz, welchen diese Methode ergibt. Jedoch, wie dies *Blix* und *Fleisch* richtig unterstreichen, hängt das weniger von der Methode selbst, als von ungenügender Sorgfältigkeit und Pedanterie in ihrer Handhabung ab.

Die Arbeit von *Blix* und besonders von *Fleisch*, welcher etwa 2500 Bestimmungen gemacht hat und für die Bestimmungen des Fehlerprozentsatzes eine statistische Methode angewendet hat, stellen die genügende Exaktheit der Methode *Bangs* außer jeden Zweifel.

Unsere Bestimmungen, welche 2000 Bestimmungen einschließen, sprechen ebenfalls für eine genügende Exaktheit der Methode *Bangs*. Der mittlere Fehlerprozentsatz in unseren Versuchen für die Petrolätherfraktion war gleich $\pm$ 4 Proz., für die Alkoholfraktion $\pm$ 5 Proz.

Bei Anwendung der Methode *Bangs* für die Fett- und Lipoidbestimmung sind wir der Beschreibung nach *Bang*[1]) gefolgt, indem wir die technischen Angaben von *Blix*[2]) in Betracht gezogen haben; die Extraktion des gebundenen Cholesterins war von uns etwas verändert, und zwar: nach 24stündigem Alkoholauszug des Löschpapierstreifchens mit Blut war der Alkohol bei Zusatz eines Tropfens 25proz. NaOH bis zur völligen Verdunstung abgedampft, und der Niederschlag wurde nach 24stündigem kalten Auszug durch Petroläther noch mit siedendem Petroläther extrahiert, wodurch eine völlige Extraktion des Cholesterins, das von seinen Estern durch die Hydrolyse mit NaOH befreit war, erreicht wurde.

Was den Lipoid-P betrifft, so wurde er kolorimetrisch nach der Methode von *Briggs*[3]) mit jenen Veränderungen bestimmt, daß statt 1 ccm 140 bis 180 mg Blut auf das Löschpapierstreifchen genommen wurden; das Löschpapierstreifchen wurde nach dem Austrocknen bei Zimmertemperatur innerhalb 2 bis 6 Stunden durch siedende Bloormischung (1 Teil Äther + 3 Teile Alkohol) innerhalb 30 Minuten extrahiert; diese Zeit war genügend, wie Kontrolluntersuchungen zeigten, für eine völlige Extraktion des lipoiden P aus den entnommenen Blutmengen. Nach 30 Minuten langer Extraktion wurde das Löschpapierstreifchen mit Blut herausgenommen, die Lösungsmittel wurden vollkommen abgedampft und der Rest durch Schwefelsäure verascht (0,5 ccm 50proz. H_2SO_4); als Katalysator diente Perhydrol (2 Tropfen); nach der Verbrennung wurden in das Probierröhrchen 5 ccm destillierten Wassers zugefügt und nachher 1 ccm Am-

---

[1]) *Bang*, diese Zeitschr. **91**, 86, 1918; Mikromethoden der Blutuntersuchung; *Pincussen*, „Mikromethodik".

[2]) *Blix*, Studies of diabetic Lipemia. Lund, 1925.

[3]) *Briggs*, Journ. of biol. chem. **53**, 1922; **59**, 1924.

moniummolybdat-Lösung (5 g Ammonii molybdänici löst man in 60 ccm H_2O und setzt zu der Lösung die Menge Schwefelsäure zu, die 15 ccm konzentrierter H_2SO_4 in 25 ccm H_2O enthält), 1 ccm 1proz. Hydrochinon- und 1 ccm 20proz. Natriumsulfitlösung (frisch bereitet), nachher wurde Wasser bis auf 25 ccm zugesetzt und die Probierröhrchen auf 5 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach der Abkühlung wurde kolorimetriert. Als Standard wurde eine Lösung von Monokaliumphosphat genommen, welche in 1 ccm 1 mg P (4,394 g auf 1 Liter H_2O) enthielt; aus dieser Urlösung wurde eine Lösung von 0,02 mg P in 1 ccm zubereitet. Die Ziffern des lipoiden P, welche bei diesen Veränderungen der Methode erhalten wurden, stimmen überein mit den Ziffern, die bei der Anwendung der gewöhnlichen Methode *Briggs* erhalten wurden.

Hund 7. Auf das Löschpapierstreifchen ist eine Blutmenge = 158 mg genommen; lipoider P = 6,68 mg-Proz. Es ist 1 ccm Blut genommen worden; lipoider P = 6,56 mg-Proz.

Hund 8. Auf das Löschpapierstreifchen ist eine Blutmenge = 164 mg genommen; lipoider P = 8,34 mg-Proz. Es ist 1 ccm Blut genommen worden; lipoider P = 8,52 mg-Proz.

Hund 10. Auf das Löschpapierstreifchen ist eine Blutmenge = 145 mg genommen; lipoider P = 7,84 mg-Proz. Es ist 1 ccm Blut genommen worden; lipoider P = 7,61 mg-Proz.

Der Fehler der Methode betrug bei uns $\pm$ 3,5 Proz. Bei allen Bestimmungen nach *Bang*, wie auch nach *Briggs*, wurden von uns zwei Parallelproben genommen; die Angaben über alle unten angeführten Tabellen stellen mittlere Ziffern von zwei Proben dar. Außerdem wurde der feste Rückstand des Blutes in den entnommenen Proben mittels Austrocknens des Löschpapierstreifchen mit der Blutmenge im Exsikkator unter vermindertem Druck bis zur Gewichtskonstanz bestimmt.

3. Über die Schwankungen der Fette und Lipoide im peripheren Blute bei normalen Hunden.

Die Aufstellung der Grenzen der physiologischen Schwankungen der Fette und Lipoide bei verschiedenen Tieren und bei ein und demselben Tiere erscheint als notwendige Bedingung für die richtige Schätzung jener Veränderungen, welche unter dem Einfluß der einen oder anderen experimentellen Einwirkung eintreten. In den weiter unten angeführten Tabellen sind die Grenzen der physiologischen Schwankungen der Fette und Lipoide für die Hunde von uns dargestellt (Bestimmung nach *Bang*; lipoider P nach *Briggs*).

Tabelle I.

Die Grenzen der Schwankungen der Fette und Lipoide im peripheren Blute verschiedener Hunde (nüchtern). 25 Tiere.

	Minimum Proz.	Maximum Proz.
Neutralfett	0,016	0,100
Freies Cholesterin	0,040	0,127
Gebundenes Cholesterin	0,030	0,112
Gesamtcholesterin	0,102	0,176
„Phosphatid"-Fraktion	0,119	0,384
Lipoider P	5,0	12,7

Tabelle II.

Die Schwankungsgrenzen der Fette und Lipoide bei einem und demselben Hunde. Untersucht innerhalb 6 Wochen zweimal wöchentlich.

	Minimum Proz.	Maximum Proz.	Grenzen der Schwankungen Proz.
Neutralfett	0,046	0,092	100,0
Freies Cholesterin	0,054	0,070	29,6
Gebundenes Cholesterin	0,056	0,074	32,1
Gesamtcholesterin	0,102	0,142	39,2
„Phosphatide"	0,207	0,286	39,1
	mg-Proz.	mg-Proz.	
Lipoider P	7,0	9,0	28,6

Tabelle III.

Die Schwankungsgrenzen der Fette und Lipoide beim Hunde innerhalb 7 Stunden (Hund 4). 5. November 1926.

	10h Proz.	11h 30' Proz.	1h Proz.	3h Proz.	5h Proz.
Neutralfett	0,045	0,049	0,039	0,043	0,040
Freies Cholesterin	0,068	0,070	0,072	0,070	0,067
Gebundenes Cholesterin .	0,061	0,058	0,058	0,060	0,054
Gesamtcholesterin	0,129	0,128	0,130	0,130	0,121
„Phosphatide"	0,207	0,196	0,194	0,225	0,208
	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.
Lipoider P	7,95	7,20	7,65	7,38	7,40

Wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, schwankt der Gehalt des Neutralfettes und der Phosphatide bei verschiedenen Hunden in ziemlich breiten Grenzen; etwas mehr konstant erscheint der Cholesteringehalt. Viel mehr konstant erscheint der Gehalt der Fette und Lipoide bei ein und demselben Hunde (Tabelle II), und endlich, es gibt keine Schwankungen innerhalb 7 Stunden, welche die Grenze der Fehler der Methode (Tabelle III) überschreiten. Aus diesen Angaben ergibt sich die Notwendigkeit der Normalaufstellung des Fett- und Lipoidgehalts im Blute bei jedem Tiere, welches der experimentellen Einwirkung unterzogen sein muß; bei der Beurteilung der einen oder anderen Veränderung muß man die Grenzen der physiologischen Schwankungen in Betracht ziehen. Unsere Ziffern des Fett- und Lipoidgehalts bei den Hunden stimmen mit den Angaben von *Bang*, *Raab*, *Agandschanjanz* (Methode von *Bang*), *Wacker* und *Hueck*, *Horiouchi*, *Rosenthal*, *Melchior*, *Licht*, *Beumer* (Methode von *Windaus* und *Autenrieth-Funk*) überein.

4. Über Veränderungen der Fette und Lipoide im peripheren Blute der Hunde bei Belastung (per os) mit Ol. olivarum.

Ziemlich breite Grenzen der physiologischen Schwankungen des Fett- und Lipoidgehalts im Blute zwingen bei der Erforschung der Fragen der Fett- und Lipoidmetabolie, von der statischen Untersuchung des Bildes der Fette und Lipoide im Blute abzusehen; genügend scharfe Ver-

änderungen der letzteren können nur unter den Bedingungen der Belastungsversuche geklärt werden, wenn eine erhöhte funktionelle Tätigkeit der Elemente, welche Beziehungen zu Resorptionsprozessen, Elimination und Metabolie der Fette und Lipoide haben, hervorgerufen und ausgeprägt wird.

Als eine Methode, die eine derartige physiologische funktionelle Belastung durchzuführen erlaubt, erscheint das Hervorrufen der alimentären Lipämie und Lipoidämie, auf deren Verlauf besonders ausgeprägt der Einfluß dieser oder jener experimentellen Einwirkungen sich zeigen muß.

Wie bekannt, ruft die Einführung fettreicher Nahrung die Erhöhung des Fettgehalts im Blute bei *Omnivoren* und *Carnivoren* (*Neisser* und *Bräuning*, *Leva*, *Cohn* und *Heimann*, *Widal*, *Bloor* u. a. bei Menschen, *Bang*, *Ssokoloff*, *Arndt* bei Hunden) hervor, welche 6 bis 8 Stunden dauert; bei *Herbivoren* wird alimentäre Lipämie bei einmaliger Verabreichung des Fettes gewöhnlich nicht beobachtet (*Edelmann*, *Versé*, *Ssokoloff* u. a.), was scheinbar durch die verlangsamte Resorption der Fette aus dem Darm erklärt wird (*Versé*, *Schönheimer*).

Bei Erforschung der alimentären Lipämie haben wir uns bemüht, 1. den Charakter und Verlauf der Kurve des Neutralfettes aufzuklären, 2. welche Veränderungen Sterine und Phosphatide bei der Lipämie erleiden und 3. die Genese dieser Veränderungen. Als Neutralfett wurde von uns das Olivenöl gebraucht, bei dessen Einführung per os nach Untersuchungen von *Bang* immer Lipämie hervorgerufen wurde. Die Belastung der Tiere (Hunde) wurde nüchtern durchgeführt (nach 12 bis 18 Stunden Hunger); das Blut wurde 1½, 3, 5, 7, 24 Stunden nach Verabreichung untersucht. Die Tiere haben die ganze Zeit dieselbe Nahrungsration erhalten: täglich 200,0 g Fleisch, 50,0 g Fett (Schweinefett) und 600,0 g Hirsebrei; Wasser ad libitum. Im ganzen waren 25 Versuche an sieben Hunden durchgeführt worden. Diese Untersuchungen mit der Einführung des Olivenöls haben folgende Resultate ergeben (s. Tabellen IV, V, VI, VII, VIII).

Tabelle IV.

Hund 5. Gewicht 7150 g.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petroläther-fraktion Proz.
23.XII.25. Präform.	0,117	0,047	0,070	0,220	0,047	0,204	8,60	0,117	0,337
Um 9h30′ per os 50,0 Ol. olivarum eingeführt (7,0 pro kg).									
Nach 1½ Std. . .	0,125	0,103	0,022	0,223	0,047	0,210	8,44	0,069	0,348
„ 3 „ . .	0,118	0,075	0,043	0,232	0,055	0,201	8,66	0,098	0,350
„ 5 „ . .	0,090	0,041	0,049	0,290	0,081	0,219	8,72	0,130	0,380
„ 7 „ . .	0,127	0,075	0,052	0,291	0,067	0,258	8,78	0,119	0,418
„ 24 „ . .	0,129	0,067	0,062	0,244	0,056	0,216	8,44	0,123	0,373
24. XII. 1925. Um 8h30′ per os 50,0 Ol. olivarum eingeführt.									
Nach 1½ Std. . .	0,116	0,054	0,062	0,231	0,057	0,195	8,44	0,124	0,347
„ 3 „ . .	0,174	0,073	0,101	0,288	0,073	0,237	8,96	0,174	0,462
„ 5 „ . .	0,173	0,102	0,071	0,291	0,060	0,276	9,87	0,131	0,464
„ 7 „ . .	0,181	0,065	0,116	0,260	0,065	0,216	8,56	0,181	0,441

Tabelle V. Hund 5. Gewicht 7000 g.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-Cholesterin Proz.	Alkohol + Petroläther-fraktion Proz.
11.XII.25. Präform.	0,144	0,092	0,052	0,244	0,050	0,234	8,5	0,102	0,388
Um 10h 10′ 100,0 Ol. olivarum per os eingeführt (14,0 pro kg).									
Nach 1½ Std. .	0,225	0,144	0,082	0,262	0,049	0,254	9,0	0,131	0,487
„ 3 „ . .	0,190	0,103	0,087	0,281	0,056	0,270	9,0	0,145	0,471
„ 5 „ . .	0,214	0,111	0,103	0,346	0,093	0,270	9,2	0,196	0,560
„ 7 „ . .	0,174	0,117	0,057	0,283	0,056	0,273	9,2	0,157	0,457
„ 24 „ . .	0,137	0,091	0,046	0,211	0,052	0,180	8,2	0,098	0,348
Um 10h 20′ per os 100,0 Ol. olivarum eingeführt.									
Nach 1½ Std. .	0,155	0,109	0,046	0,222	0,052	0,195	8,4	0,098	0,377
„ 3 „ . .	0,266	0,137	0,089	0,301	0,098	0,189	8,32	0,187	0,527
„ 5 „ . .	0,135	0,106	0,029	0,287	0,063	0,264	9,24	0,091	0,422
„ 7 „ . .	0,128	0,085	0,043	0,295	0,066	0,266	9,2	0,109	0,423

Tabelle VI. Hund 6. Gewicht 11300 g.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz	„Phosphatide" Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petroläther-fraktion Proz.
23.I.1926. Präform.	0,137	0,047	0,090	0,220	0,062	0,165	7,0	0,152	0,357
Um 10h per os 100,0 Ol. olivarum eingeführt (8,8 pro kg).									
Nach 1½ Std. .	0,167	0,074	0,093	0,211	0,056	0,165		0,149	0,378
„ 3 „ . .	0,165	0,114	0,051	0,264	0,062	0,231		0,113	0,429
„ 5 „ . .	0,132	0,075	0,057	0,256	0,065	0,210	12,32	0,122	0,388
„ 7 „ . .	0,187	0,125	0,062	0,270	0,064	0,234		0,126	0,457

Tabelle VII. Hund 4. Gewicht 10000 g.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petroläther-fraktion Proz.
12.I.1926. Präform.	0,126	0,075	0,051	0,187				0,313
Um 9h 30′ per os 100,0 Ol. olivarum eingeführt (10,0 pro kg).								
Nach 3 Std.	0,162	0,132	0,032	0,243				0,405
„ 5 „	0,167	0,067	0,100	0,258				0,425
„ 7 „	0,124	0,068	0,056	0,210				0,334
„ 24 „	0,113	0,038	0,075	0,180				0,293
13. I. 1926. Um 10h per os 100,0 Ol. olivarum eingeführt.								
Nach 3 Std.	0,174	0,076	0,098	0,283	0,055	0,279	0,153	0,457
„ 5 „	0,213	0,134	0,079	0,309	0,092	0,219	0,171	0,521
„ 7 „	0,166	0,081	0,085	0,248	0,062	0,207	0,147	0,414

Tabelle VIII.

Hund 2. Gewicht 8000 g.

	Petrolätherfraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkoholfraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Gesamtcholesterin Proz.	Alkohol + Petrolätherfraktion Proz.
23. X. 1925. Präform.	0,120							
1. Per os 50,0 Ol. olivarum eingeführt.								
Nach 1½ Std. . . .	0,137							
„ 3 „ . . .	0,175							
„ 5 „ . . .	0,138							
29. I. 1926. Präform.	0,156	0,060	0,096					
2. Per os 50,0 Ol. olivarum eingeführt.								
Nach 1½ Std. . . .	0,204	0,177	0,029					
„ 3 „ . . .	0,137	0,063	0,074					
„ 5 „ . . .	0,120	0,048	0,072					
2. XI. 1925. Präform.	0,145	0,055	0,090	0,239				0,384
3. Per os 50,0 Ol. olivarum eingeführt.								
Nach 1½ Std. . . .	0,128	0,074	0,054	0,252				0,380
„ 3 „ . . .	0,137	0,062	0,075	0,348				0,485
„ 5 „ . . .	0,188	0,118	0,070	0,312				0,500
5. XI. 1925. 4. Per os 50,0 Ol. olivarum eingeführt.								
6. XI. 1925. Präform.	0,158	0,060	0,098	0,255				0,413
5. Per os 50,0 Ol. olivarum eingeführt.								
Nach 1½ Std. . . .	0,213	0,172	0,042	0,250				0,463
„ 3 „ . . .	0,190	0,163	0,027	0,262				0,452
„ 5 „ . . .	0,117	0,034	0,083	0,273				0,390
„ 7 „ . . .	0,115	0,050	0,065	0,298				0,413
18. XI. 1925. 6. Per os 50,0 Ol. olivarum eingeführt.								
Präform.	0,124	0,062	0,062	0,241	0,052	0,225	0,114	0,365
Nach 1½ Std. . . .	0,233	0,211	0,022	0,336	0,073	0,309	0,095	0,569
„ 3 „ . . .	0,127	0,111	0,016	0,381	0,084	0,345	0,100	0,508
„ 5 „ . . .	0,142	0,105	0,037	0,233	0,050	0,216	0,087	0,375
„ 7 „ . . .	0,133	0,080	0,058	0,338	0,084	0,282	0,142	0,471
„ 24 „ . . .	0,141	0,075	0,066	0,330	0,058	0,342	0,125	0,471
19. XI. 1925. 7. Um 10h per os 50,0 Ol. olivarum eingeführt.								
Nach 1½ Std. . . .	0,159	0,075	0,029		0,137		0,166	
3 3 „ . . .	0,180	0,130	0,073		0,132		0,205	
5 5 „ . . .	0,120	0,107	0,070		0,150		0,220	
7 7 „ . . .	0,116	0,060	0,056	0,465	0,087	0,465	0,183	0,581
30. XI. 1925. 8. Um 9h20′ per os 60,0 Ol. olivarum eingeführt (6,2 pro kg).								
Präform.	0,157	0,180	0,077	0,328	0,066	0,315	0,143	0,485
Nach 1½ Std. . . .	0,188	0,156	0,032	0,403	0,095	0,351	0,127	0,591
„ 3 „ . . .	0,184	0,051	0,033	0,340	0,087	0,276	0,120	0,524
„ 5 „ . . .	0,146	0,072	0,074	0,343	0,066	0,351	0,135	0,889
„ 7 „ . . .	0,133	0,086	0,047	0,225	0,047	0,210	0,131	0,358
„ 24 „ . . .	0,115	0,074	0,041	0,384	0,117	0,264	0,158	0,499

Tabelle VIII (Fortsetzung).

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petroläther-fraktion Proz.
1. XII. 1926.	9. Um 10h30' per os 60,0 Ol. olivarum eingeführt.							
Nach 1½ Std. . . .	0,153	0,070	0,083		0,119		0,202	
„ 3 „ . . .	0,266	0,180	0,086		0,119		0,205	
„ 5 „ . . .	0,320	0,286	0,034		0,165		0,199	
„ 7 „ . . .	0,360	0,300	0,060	0,443	0,165	0,216	0,225	0,803
8. XII. 1925. Präform.	0,139	0,076	0,063					
	10. Um 9h15' per os 60,0 Ol. olivarum eingeführt.							
Nach 1½ Std. . . .	0,187	0,157	0,030					
„ 3 „ . . .	0,185	0,142	0,043					
„ 5 „ . . .	0,205	0,165	0,040					
„ 7 „ . . .	0,178	0,123	0,055					
„ 24 „ . . .	0,177	0,100	0,077	0,476	0,115	0,408	0,215	0,653
9. XII. 1926.	11. Um 9h30' per os 60,0 Ol. olivarum eingeführt.							
Nach 1½ Std. . . .	0,234			0,518	0,140	0,402		0,752
„ 3 „ . . .	0,216				0,140			
„ 5 „ . . .	0,220				0,134			
„ 7 „ . . .	0,197				0,124			
5. I. 1926.	12. Um 10h30' per os 60,0 Ol. olivarum eingeführt.							
Präform.	0,130	0,089	0,041	0,462	0,133	0,336	0,174	0,582
Nach 1½ Std. . . .	0,169	0,103	0,066	0,533	0,186	0,300	0,252	0,702
„ 3 „ . . .	0,212	0,155	0,067	0,558	0,203	0,294	0,270	0,770
„ 5 „ . . .	0,106	0,070	0,036	0,480	0,149	0,321	0,185	0,586
„ 7 „ . . .	0,165	0,070	0,095	0,534	0,143	0,420	0,238	0,698

Wie aus den Tabellen (nicht angeführte Versuche ergaben den oben angeführten analoge Resultate) ersichtlich ist, gibt die Belastung mit Olivenöl folgende Veränderungen im Bilde der Fette und Lipoide des Blutes:

a) *Neutralfett.* Die Einführung des Olivenöls ruft immer eine Zunahme des Neutralfettes im Blute auf 50 bis 200 Proz. hervor; das Maximum der Zunahme tritt gewöhnlich 1½ bis 3 Stunden nach der Einführung ein, wobei die *Höhe der Zunahme von dem Quantum des eingeführten Öles nicht abhängig ist* (Tabellen IV und V), und es gelingt nicht, eine Proportionalität in dieser Beziehung festzustellen. In bezug auf den Charakter und Verlauf der lipämischen Kurve kann man folgendes bemerken: Bei Einführung mittlerer Dosen Olivenöls (6 bis 10,0 pro Kilogramm) tritt 3 Stunden nach der Einführung eine Zunahme des Neutralfettes, nach 5 Stunden ein Zurückgehen zur Norm oder unter die Norm (hypolipämische Phase) ein; unmittelbar nach dieser hypolipämischen Phase tritt 7 Stunden nach der Einführung wieder Zunahme des Neutralfettes ein. In einigen Fällen tritt die hypolipämische Phase schon 3 Stunden nach der Verabreichung ein, in anderen nach der fünften Stunde, und kann dann bis zum nächsten Tage dauern. Bei wiederholter Einführung derselben Dosis Olivenöls am nächsten Tage wird die hypolipämische Phase in der Mehrzahl der Fälle nicht beobachtet, ebenso wie sie bei der Einführung

großer Dosen Olivenöls (10,0 bis 15,0 pro Kilogramm) nicht eintritt. Wiederholte Einführung des Olivenöls (Tabelle VIII) verändert im allgemeinen den Charakter der lipämischen Kurve nicht, und es ist uns nicht gelungen, die Erscheinungen „der Angewöhnung" zu konstatieren; im Gegenteil, es wird eher die Tendenz erhöhter Zunahme der lipämischen Kurve beobachtet. *Bang*[1]) spricht in seinen Untersuchungen über Lipämien von der „Angewöhnung" von Fett, jedoch ist aus einer der von ihm selbst angeführten Tabelle ersichtlich, daß von Angewöhnung keine Rede sein kann:

Hund 3.

	Präformiert Proz.	Nach 2 Stunden Proz.	Nach 4 Stunden Proz.	Nach 9 Stunden Proz.
	3. I. 1918. 50,0 Olivenöl.			
(Petrolätherfraktion)	0,15	0,16	0,19	0,15
	4. V. 1918. 35,0 Olivenöl.			
	0,12	0,18	0,20	0,15

Hund 4.

	Präformiert Proz.	Nach 2 Stunden Proz.	Nach 4 Stunden Proz.	Nach 9 Stunden Proz.
	28. I. 1918. 50,0 Olivenöl.			
(Petrolätherfraktion)	0,14	0,29	0,28 (nach 3 Std.)	0,26 (nach 6 Std.)
	13. V. 1918. 30,0 Olivenöl.			
	0,16	0,26	0,26	0,23

b) *Cholesterin.* Bei Belastung mit Olivenöl bzw. Neutralfett treten immer Veränderungen des Cholesterins im Blute ein: Bei der Einführung der mittleren Dosen des Ol. olivarum (6,0 bis 10,0 pro Kilogramm) tritt nach $1\frac{1}{2}$ bis 3 Stunden Abnahme des Cholesterins im Blute ein; 7 bis 24 Stunden nach der Einführung kehrt die Quantität des Cholesterins im Blute gewöhnlich zur Norm zurück. Diese Abnahme des Cholesterins geschieht ausschließlich auf Kosten des freien Cholesterins; gebundener Cholesterinester verändert sich entweder gar nicht oder nimmt etwas zu.

Bei der Einführung großer Dosen Olivenöls (10,0 bis 15,0 pro Kilogramm), ebenso bei wiederholten (am nächsten Tage) Einführungen mittlerer Dosen wird die Abnahme des Cholesterins nicht beobachtet; im Gegenteil, es wird eine Zunahme auf 60 bis 100 Proz. bemerkt, wobei die Zunahme hauptsächlich auf Kosten des freien Cholesterins vor sich geht. *Wiederholte chronische Einführungen des Olivenöls* (Tabelle VIII) *rufen nicht Hyperlipämie, sondern Hypercholesterinämie* hervor, wobei die Zunahme des Cholesterins auf Kosten seiner Ester geschieht.

c) *Lipoider Phosphor* und *„Phosphatid"-Fraktion.* Die Einführung des Olivenöls wird gewöhnlich von der Zunahme der „Phosphatid"-Fraktion begleitet; diese Zunahme ist schwach ausgedrückt und erreicht ihr Maximum in der fünften bis siebenten Stunde nach der Einführung;

[1]) „Über Lipämie", III. Mitteilung, diese Zeitschr. **91**, 111, 1918.

insofern, als parallel damit eine gewisse Zunahme des lipoiden P beobachtet wird, erfolgt die Zunahme der Phosphatid-Fraktion auf Kosten der Phosphatide und nicht auf Kosten der Seifen, welche in diese Fraktion eingeschlossen sind.

Wiederholte chronische Einführung des Olivenöls ruft neben der Hypercholesterinämie auch eine Zunahme der Phosphatidfraktion und parallel eine Zunahme des lipoiden Phosphors hervor.

Auf Grund der angeführten Angaben können wir ebenso wie *Reicher*, *Arndt* konstatieren, daß Lipämie, welche durch Einführung des Olivenöls bzw. Neutralfettes hervorgerufen wird, immer von der Veränderung des Cholesterin- und Phosphatidgehalts des Blutes begleitet ist; wobei besonders charakteristisch die Kurve der Cholesterinveränderung erscheint, nämlich: *Bei Einführung mittlerer Dosen Olivenöls entspricht der Periode der größten*

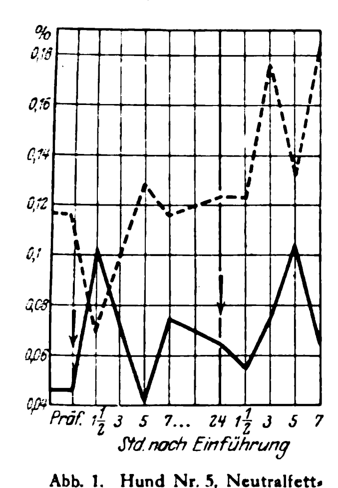


Abb. 1. Hund Nr. 5. Neutralfett- und Cholesterinblutspiegel nach Einführung (↓) per os 50,0 Ol olivarum.
——— Neutralfett.
············ Cholesterin.

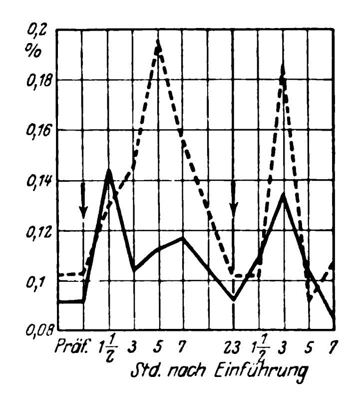


Abb. 2. Hund Nr. 5. Neutralfett- und Cholesterinblutspiegel nach Einführung (↓) per os 100,0 Ol. olivarum.
——— Neutralfett.
············ Cholesterin.

Neutralfettzunahme die am stärksten ausgedrückte Abnahme des Cholesterins; der hypolipämischen Periode dagegen entspricht das Maximum der Cholesterinzunahme (Kurve 1).

Auf diese Weise stellt sich bei einmaliger Einführung mittlerer Dosen Olivenöls die umgekehrte Proportionalität in den Veränderungen des Neutralfettes und Cholesterins ein. Die Einführung großer Dosen Olivenöls und seine wiederholte Einführung ergibt ein anderes Bild des Verlaufs der Cholesterinkurve: die umgekehrte Proportionalität zwischen dem Neutralfett und Cholesterin ist ausgeglichen, der Gehalt des letzteren im Blute wächst allmählich und erreicht das Maximum 3 bis 5 Stunden nach der Einführung (Kurve 2).

Die Experimente von *Iwatsuru*[1]) (Tabelle III, Versuch 12 und 13, Tabelle IV, Versuch 6) beweisen, daß auch bei Kaninchen die chronische

[1]) *Iwatsuru*, Pflügers Arch. **214**, H. 3, 1926.

Einführung des Olivenöls eine Cholesterinämie und Phosphatidämie hervorruft.

Die bestimmte Abhängigkeit, die wir durch die Schwankungen der Neutralfett- und Cholesterin-Kurve bei Belastung mit Olivenöl festgestellt haben, ruft die Frage nach der Genese dieser Abhängigkeit, nach dem Mechanismus sowie den Wechselbeziehungen zwischen Neutralfett und Cholesterin hervor. Das Bild des Fettes und Cholesterins des Blutes ist eine Resultante der Resorptionsprozesse im Blut und der Elimination dieser Stoffe aus dem letzteren. Und da man damit rechnen kann (*Bacmeister*, *Rothschild*, *Bürger* und *Beumer*, *Eppinger* u. a.), daß die Elimination des Cholesterins hauptsächlich in die Galle stattfindet, war es notwendig aufzuklären, ob die Cholesterinschwankungen im Blute bei Belastung mit Olivenöl, und vor allem seine Abnahme innerhalb der ersten 3 Stunden nach der Einführung mittlerer Dosen Ol. olivar. als Resultat seiner Ausscheidung durch die Galle erscheinen. Jedoch der Umstand, daß die Einführung großer Dosen Olivenöls nicht eine Abnahme des Cholesterins im Blute hervorrufen, weist auf die Unabhängigkeit der Cholesterinabnahme im Blute von dem Einfluß des Olivenöls auf die Cholesterinausscheidung durch die Galle hin. Die von uns durchgeführten Untersuchungen[1]) an Hunden mit chronischen Fisteln der Gallenblase und Ducti choledochi zeigten, daß die Zunahme des Cholesterins in der Galle bei peroraler Einführung des Olivenöls so unbedeutend ist, daß sie die Ursache der Cholesterinabnahme im Blute nicht sein kann; als Beispiel führe ich einen Versuch[2]) an.

Hund 3. Gewicht 15,0 kg.

26. November 1926, Operation der Fistelanlegung des Ducti choledochi. Exstirpation der Gallenblase.

18. XII. 1926	Galle-Cholesterin *)		Blut-Cholesterin **)
	mg	mg-Proz.	Proz.
Norm. 12h–2h 36 ccm Galle . . . per os 15 ccm Galle eingeführt	3,6	10,0	0,135 (1h)
Um 2h per os 150,0 Ol. olivarum eingeführt.			
2h–4h 34 ccm Galle . . . per os 15 ccm Galle eingeführt	3,87	11,4	0,109 (4h)
4h–6h 28 ccm Galle . . . per os 15 ccm Galle eingeführt	4,2	15,0	0,150 (5h)
6h–8h 28 ccm Galle . . . per os 15 ccm Galle eingeführt	3,19	11,4	0,140 (8h)

*) Bestimmung nach *Bloor, Pelkan* und *Allen*. — **) Bestimmung nach *Autenrieth-Funk-Engelhardt*.

[1]) Zit. nach Manuskript.

[2]) Ausführlich über den Cholesteringehalt in der Galle bei alimentärer Lipämie und Lipoidämie in einer der nächsten Mitteilungen.

Wenn auf diese Weise die Cholesterinabnahme im Blute unabhängig von der Elimination durch die Galle sind, so ist augenscheinlich, daß sie mit Prozessen, welche in den bestimmten Organen bzw. Geweben vor sich gehen, verbunden sind. Gerade dadurch ergibt sich die Notwendigkeit, bei alimentärer Lipämie die Verteilung des Neutralfettes, des Cholesterins und der Phosphatide im zu- und abströmenden Blute der inneren Organe zu erforschen.

5. Die Verteilung des Neutralfettes, Cholesterins und der Phosphatide in der Arterie und den Venen der inneren Organe in der Norm und bei alimentärer Lipämie.

Methodik. An dem Hunde wurde unter Morphium-Äthernarkose eine Laparotomie ausgeführt; außer dem Längsschnitt vom Proc. xiphoideus bis zur Linea biiliaca wurden zwei Querschnitte längs der unteren Rippenbogen gemacht; das Blut aus den Venen der inneren Organe, welche in situ geblieben sind, wurde mit einer Spritze auf Löschpapierstreifchen nach *Bang* gebracht und sofort gewogen. Die Zeit, innerhalb welcher das Blut aus der Arterie und den Venen entnommen wurde, betrug 15 bis 25 Minuten; bei Hund 14 (Tabelle IX), 24 (Tabelle X), 16 (Tabelle XII), 27 (Tabelle XIII) wurde das Blut aus der Arterie und Vena lienalis gleichzeitig entnommen. Die Ziffern vor den Namen des Gefäßes zeigen die Reihenfolge der Blutentnahme an, die Ziffern in den Klammern geben den Gehalt an Fetten und Lipoiden des festen Blutrückstandes an. Der feste Rückstand wurde nach *Bang* bestimmt. In den Versuchen mit der Blutentnahme nur aus der Arterie, Vena femoralis und dem rechten Ventrikel waren die Tiere ohne Narkose; das Blut aus dem rechten Ventrikel wurde unmittelbar mittels Einstichs mit einer langen, dünnen Nadel durch den dritten rechten intercostalen Raum genommen; als Kriterium, daß die Nadel in den rechten Ventrikel gelangte, diente das Erscheinen des venösen Blutes in der Nadel und seine Schwankungen synchronisch mit dem Rhythmus des Herzens.

Im ganzen wurden sechs Versuche an normalen Hunden und drei Versuche mit Belastung mittels Ol. olivarum angestellt.

Die Kontrollversuche zeigten, daß 1. die Narkose und Laparotomie den Gehalt des Fettes und der Lipoide im peripheren Blute in den Grenzen der physiologischen Schwankungen verändern mit der Tendenz einer Zunahme von 8 bis 10 Proz.; 2. der Gehalt der Fette und Lipoide in verschiedenen Abschnitten des arteriellen Systems (V. pulmonalis—Aorta abdominalis—Art. femoralis) gleich ist, und 3. im Verlauf des Versuchs (15 bis 20 Minuten) die Quantität des Fettes und der Lipoide in der Arterie fast unveränderlich war [die Schwankungen betrugen etwa 5 bis 8 Proz.][1]).

Wie aus den angeführten Tabellen (IX, X, XI) ersichtlich ist, erscheint der Gesamtgehalt des Fettes und der Lipoide in verschiedenen Venen als gleich, indem er Schwankungen innerhalb der Fehlergrenzen gibt, die bei dem akut angestellten Versuch möglich sind. Die Ausnahmen bilden die V. suprarenalis und in einem Versuch die Vena renalis, wo der Gesamtgehalt des Fettes und der Lipoide verhältnismäßig mit den übrigen Venen

---

1) Ich spreche Herrn Dr. *E. Sterkin* für seine freundliche Hilfe bei der Anstellung der Versuche meinen innigsten Dank aus.



Tabelle IX.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phos-phatide" Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petroläther-frakt. Proz.
				20. III. 1926. Hund 9.					
7. V. pulmonalis	0,119	0,071	0,048	0,276					0,395
5. Aorta abdom.	0,119	0,072	0,047	0,275					0,394
1. V. lienalis	0,142	0,110	0,032	0,211	0,058	0,162		0,090	0,353
2. V. porta	0,117	0,046	0,071	0,273	0,097	0,181		0,143	0,390
4. V. hepatica	0,105	0,070	0,035	0,257	0,078	0,178		0,113	0,362
3. V. suprarenalis	0,113	0,059	0,054	0,274					0,387
6. V. cava infer.	0,130	0,064	0,076	0,272					0,402
				28. III. 1926. Hund 12.					
4. Aorta abdom.	0,145	0,083	0,062	0,372					0,517
1. V. lienalis	0,174	0,139	0,035						
2. V. hepatica	0,140	0,089	0,051	0,333					0,473
3. Das periph. Blut (Ohr)	0,135	0,092	0,043	0,363					0,438
5. Rechter Vorhof	0,143	0,060	0,083	0,350					0,493
				6. IV. 1926. Hund 14.					
2. A. lienalis	0,169	0,109	0,060	0,233	0,033	0,257	8,81	0,093	0,393
2. V. lienalis	0,182	0,152	0,030	0,188	0,046	0,158	7,63	0,076	0,370
1. V. femoralis	0,163	0,100	0,063	0,229	0,059	0,185	9,0	0,122	0,392
3. V. hepatica	0,150	0,105	0,045	0,229	0,056	0,193		0,101	0,379
4. V. suprarenalis	0,170	0,116	0,054	0,397	0,058	0,293	10,0	0,112	0,567
5. V. renalis	0,179	0,084	0,095				9,8		
6. Rechter Vorhof	0,170	0,100	0,070	0,273	0,048	0,282		0,114	0,443

Tabelle X. Hund 24. Hungern 60 Stunden.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phos-phatide" Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petroläther-frakt. Proz.
1. A. lienalis	0,180 (0,70)	0,091 (0,34)	0,089 (0,36)	0,300 (1,17)	0,079 (0,30)	0,240 (0,96)	9,4 (37,6)	0,168 (0,66)	0,480 (1,87)
1. V. lienalis	0,166 (0,61)	0,121 (0,44)	0,045 (0,17)	0,332 (1,22)	0,081 (0,32)	0,282 (0,97)	8,1 (31,8)	0,126 (0,49)	0,498 (1,89)
2. V. femoralis	0,231 (0,94)	0,094 (0,38)	0,135 (0,56)	0,288 (1,16)	0,081 (0,32)	0,216 (0,88)	10,0 (40,0)	0,216 (0,88)	0,519 (2,10)
3. V. hepatica	0,135 (0,52)	0,037 (0,13)	0,098 (0,39)	0,335 (1,28)	0,100 (0,35)	0,227 (0,99)	10,1 (40,8)	0,198 (0,74)	0,470 (1,80)
4. Peripher. Blut (Ohr)	0,173 (0,66)	0,064 (0,24)	0,109 (0,42)	0,374 (1,44)	0,081 (0,30)	0,345 (1,36)	7,1 (28,7)	0,190 (0,72)	0,547 (2,10)
5. V. suprarenalis	0,183 (0,72)	0,089 (0,34)	0,094 (0,38)	0,424 (1,81)	0,102 (0,39)	0,363 (1,36)	10,2 (41,0)	0,196 (0,71)	0,607 (2,33)
6. V. renalis	0,219 (0,87)	0,100 (0,39)	0,119 (0,48)	0,383 (1,52)	0,073 (0,29)	0,396 (1,51)	10,2 (41,0)	0,192 (0,77)	0,602 (2,39)
7. V. cava sup.	0,160 (0,61)	0,070 (0,26)	0,090 (0,35)	0,409 (1,56)					0,569 (2,17)

Tabelle XI.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.
	Hund 35. 2. XI. 1926.						
Rechter Ventrikel .	0,142 (0,69)	0,077 (0,37)	0,065 (0,32)		0,086 (0,42)	12,9	0,151 (0,74)
A. femoralis	0,091 (0,43)	0,071 (0,34)	0,020 (0,09)		0,068 (0,33)	10,0	0,088 (0,42)
V. femoralis	0,104 (0,49)	0,037 (0,17)	0,067 (0,32)		0,086 (0,42)	11,8	0,153 (0,74)
	Hund 36. 11. XI. 1926.						
Rechter Ventrikel .	0,101 (0,54)	0,045 (0,26)	0,056 (0,28)		0,063 (0,36)	12,8	0,119 (0,64)
A. femoralis	0,111 (0,60)	0,087 (0,46)	0,024 (0,14)		0,055 (0,29)	12,0	0,079 (0,43)
V. femoralis	0,101 (0,55)	0,032 (0,18)	0,069 (0,43)		0,058 (0,32)	12,4	0,127 (0,75)

und Arterien gesteigert ist (Vena suprarenalis bei Hund 14 durchschnittlich auf 60 Proz., bei Hund 24 auf 20 Proz., bei Hund 9 ohne Veränderung; Vena renalis bei Hund 24 auf 20 Proz.).

Was die einzelnen Fraktionen betrifft, so ist ihr Gehalt in verschiedenen Venen verschieden, nämlich:

a) *Der größte Gehalt des Neutralfettes,* im Vergleich mit der Arterie und den übrigen Venen in allen Versuchen, wurde in der *Vena lienalis* konstatiert; die Menge des Neutralfettes in dieser Vene ist um 30 bis 50 Proz. größer als in der Arterie; in der Vena hepatica ist der Gehalt des Neutralfettes gleich dem Gehalt in der Arterie; seine Abnahme in dieser Vene wird bei Hungern (Hund 24, Tabelle X) beobachtet. In den übrigen Venen ist die Menge des Neutralfettes geringer als in der Arterie, in der Vena femoralis, suprarenalis und renalis kann sie gleich oder sogar etwas größer als in der Arterie sein (V. renalis bei Hungern). Es ist notwendig zu bemerken, daß gewöhnlich, aber nicht in der Regel, die Menge des Neutralfettes in der Arterie größer als im rechten Herzen ist.

b) *Der geringste Gehalt des Cholesterins* (gesamt) in allen Versuchen ist in der Vena lienalis im Vergleich mit der Arterie und den übrigen Venen gefunden worden; in anderen Venen ist der Gehalt des Cholesterins größer als in der Arterie. Was die Wechselbeziehungen zwischen freiem und gebundenem Cholesterin betrifft, so kann man folgendes konstatieren: Am *schärfsten ist die Abnahme des freien Cholesterins in der Vena lienalis (auf 50 bis 30 Proz.) im Vergleich mit der Arterie* zum Ausdruck gekommen; der Gehalt des gebundenen Cholesterins in der Vena lienalis verändert sich entweder nicht, oder ist leicht erhöht.

Eine Abnahme des freien Cholesterins (15 bis 25 Proz.) im Vergleich mit der Arterie wird in der Vena hepatica bemerkt (mit Ausnahme des Hungerversuchs, bei dem in der Vena hepatica die Cholesterinmenge zunimmt; aber dabei erfolgt die Zunahme auf Kosten des gebundenen Cholesterins).

In den übrigen Venen nimmt der Gehalt des freien sowie des gebundenen Cholesterins zu, wobei die größte Zunahme des freien Cholesterins in der Vena renalis stattfindet.

Auf diese Weise enthält das venöse Blut (mit Ausnahme der Vena lienalis) mehr Cholesterin als das arterielle; diese Zunahme geschieht hauptsächlich auf Kosten des freien Cholesterins (mit Ausnahme der Vena hepatica).

Unsere Angaben betreffs des Cholesteringehalts im venösen Blute, seine Zunahme in diesem im Vergleich zu dem arteriellen stimmen mit den Angaben der französischen Autoren überein (*Porak* und *Quinquaud*, Vena suprarenalis, *Colombies*, Vena renalis, *Grigaut* und *Jovanovitch*, *Abelous* und *Soula*, *Nitzescu* und *Cadariu*, Vena femoralis und rechtes Herz). Die Zunahme des Cholesterins in der Vena lienalis, auf welche *Abelous* und *Soula*, *Laporte*, *Grigaut* und *Jovanovitsch* hinweisen, konnten wir in der Norm kein einziges Mal (sechs Versuche) finden; im Gegenteil, es wurde immer seine Abnahme im Vergleich mit dem Gehalt in der Arterie beobachtet.

c) In bezug auf Phosphatide bzw. lipoiden P können wir keine Abnahme in der Vena lienalis im Vergleich mit der Arterie bemerken. In den übrigen Venen nähert sich der Gehalt des lipoiden P seinem Gehalt in der Arterie; beständige Zunahme des lipoiden P bzw. der Phosphatide wird in der Vena suprarenalis, hepatica und renalis konstatiert.

Die Wechselbeziehungen zwischen den einzelnen Fraktionen der Fette und Lipoide in der Arterie und den Venen erfordern vor allem, die bestimmten Wechselbeziehungen zwischen Neutralfett und Cholesterin in der Vena lienalis hervorzuheben. Die Abnahme des Cholesterins in dieser letzteren, seine Zurückhaltung eo ipso in der Milz, wird immer von einer bedeutenden Zunahme des Neutralfettes begleitet; eine ebensolche, aber weniger scharf ausgedrückte Veränderung der Wechselbeziehung zwischen Neutralfett und Cholesterin wird in dem arteriellen Blute im Vergleich mit dem Blute des rechten Herzens bemerkt: in der Arterie wird, parallel mit der Abnahme des Cholesterins und seiner Zurückhaltung in der Lunge, eine Zunahme des Neutralfettes beobachtet. Die übrigen Venen zeigen in der Norm derartig bestimmte Veränderungen der Wechselbeziehung zwischen Neutralfett und Cholesterin wie in der V. lienalis nicht. Auf diese Weise zeigt die Verteilung der Fette und Lipoide in den Venen der inneren Organe an, daß schon in der Norm in bestimmten Organen einerseits die Elimination und andererseits die Abgabe in das Blut der einzelnen Fraktionen der Fette und Lipoide stattfindet. Diese Prozesse der Elimination und der Abgabe sind besonders ausgeprägt unter den Bedingungen der Fettbelastung der Tiere.

In Tabelle XII ist die Verteilung der Fette und Lipoide im venösen Blute der inneren Organe in jener Periode der alimentären Lipämie angeführt, welche von uns oben als hypolipämische charakterisiert wurde: bei der Einführung mittlerer Dosen Olivenöls tritt in der fünften Stunde nach der Einführung die Abnahme des Neutralfettes und parallele Zunahme des Cholesterins auf.

Wie aus den Angaben der Tabelle ersichtlich, erscheint *diese Abnahme des Neutralfettes und die Zunahme des Cholesterins im peripheren Blute als Abbild dessen, was wir in der Vena hepatica* haben, nämlich: In der Vena hepatica haben wir den geringsten Gehalt des Neutralfettes und den größten des Cholesterins im Vergleich mit den übrigen Venen und Arterien. In den übrigen Venen ist die Verteilung des Fettes und Cholesterins ebenso wie in der Norm, während in der Vena lienalis wie gewöhnlich ohne Belastung eine scharf

Tabelle XII.

16. April 1926. Hund 16. Gewicht 8 kg.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phos-phatide" Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petrol-ätherfrakt. Proz.
Präform.	0,165 (0,57)	0,087 (0,34)	0,078 (0,23)	0,236 (0,94)	0,090 (0,35)	0,114 (0,46)		0,168 (0,58)	0,401 (1,51)

Um 9h45′ morgens per os 80,0 Ol. olivar. eingeführt (10,0 pro kg).
Um 2h30′ ist Morphium unter die Haut injiziert (5 ccm 2proz. Lösung).
Um 2h40′ Äthernarkose; um 2h45′ Laparotomie.

1. Aorta abdom.	0,212 (0,72)	0,128 (0,45)	0,084 (0,27)	0,192 (0,65)	0,062 (0,20)	0,123 (0,44)	9,74 (34,0)	0,146 (0,47)	0,404 (1,37)
2. V. lienalis . .	0,187 (0,65)	0,165 (0,56)	0,022 (0,09)	0,240 (0,83)	0,070 (0,25)	0,174 (0,60)	9,74 (34,0)	0,092 (0,34)	0,427 (1,48)
3. V. hepatica .	0,174 (0,55)	0,074 (0,23)	0,100 (0,32)	0,229 (0,71)	0,090 (0,31)	0,105 (0,24)		0,190 (0,63)	0,403 (1,26)
4. V. porta . . .	0,203 (0,70)	0,114 (0,40)	0,089 (0,30)	0,257 (0,86)	0,066 (0,22)	0,169 (0,52)	8,24 (28,6)	0,155 (0,52)	0,460 (1,56)
5. V. femoralis .	0,216 (0,77)	0,118 (0,43)	0,098 (0,34)	0,216 (0,74)	0,070 (0,25)	0,135 (0,46)		0,168 (0,59)	0,432 (1,51)
6. Peripher. Blut (Ohr)	0,158 (0,55)	0,070 (0,24)	0,088 (0,31)	0,257 (0,86)	0,105 (0,37)	0,162 (0,45)		0,193 (0,68)	0,415 (1,41)
7. Rechter Vorhof	0,171 (0,57)	0,071 (0,25)	0,100 (0,32)	0,213 (0,71)	0,066 (0,22)	0,144 (0,50)	9,41 (33,7)	0,166 (0,59)	0,384 (1,28)
8. Linker Vorhof	0,220 (0,74)	0,131 (0,47)	0,089 (0,27)	0,200 (0,67)	0,059 (0,19)	0,142 (0,48)		0,148 (0,46)	0,420 (1,41)

Im Duodenum Vorhandensein von Ol. olivarum; Chylusgefäße sind gefüllt, von milchweißer Farbe.

ausgedrückte Abnahme des Cholesterins und parallele Zunahme des Neutralfettes stattfindet; *die Beziehung zwischen Neutralfett und Cholesterin in der Vena hepatica erscheint als entgegengesetztes Abbild der Beziehung in der Vena lienalis.*

Es ist noch notwendig, die Tatsache zu unterstreichen, daß wir in diesem Versuche sowie auch in den anderen (weiter unten und in der nachfolgenden Mitteilung) mit der Einführung des Olivenöls in keinem Falle die relative Zunahme des Neutralfettes weder in der Vena porta noch im rechten Vorhof beobachtet haben, obwohl die Chylusgefäße gefüllt waren, milchweiße Farbe besaßen; der größte Gehalt des Neutralfettes wurde immer, mit Ausnahme der Vena lienalis, in dem arteriellen Blute beobachtet. In der Tabelle XIII ist die Verteilung der Fette und Lipoide im venösen Blute der inneren Organe bei der Einführung großer Dosen Olivenöls dargestellt, wenn in dem peripheren Blute, wie oben festgestellt wurde, gleichzeitig mit der Zunahme des Neutralfettes auch die Zunahme des Cholesterins beobachtet wird. Die Angaben, welche in der Tabelle angeführt sind, zeigen an, daß das Maximum des Cholesteringehalts in der *Vena lienalis beobachtet wird* und dabei das Neutralfett in der Vena lienalis im Vergleich mit anderen Venen nicht zunimmt. Das Maximum des Gehalts des Neutralfettes

Tabelle XIII.

15. April 1926. Hund 27. Gewicht 7 kg.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petrol-ätherfrakt. Proz.	Lipoider P mg-Proz.
Präform.	0,123	0,059	0,064	0,220	0,056	0,180	0,115	0,343	

Um 10h per os 100,0 Ol. olivar. eingeführt (14,3 pro kg).
Um 12h30′ Morphium subkutan (5 ccm 2proz. Lösung).
Um 12h50′ Äthernarkose.
Um 1h Laparotomie; das Blut ist entnommen aus:

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petrol-ätherfrakt. Proz.	Lipoider P mg-Proz.
1. V. lienalis . .	0,305	0,125	0,180	0,339	0,100	0,222	0,280	0,644	
2. A. lienalis . .	0,228	0,160	0,068	0,246	0,065	0,195	0,135	0,474	9,2
3. V. hepatica .	0,220	0,120	0,100	0,193	0,030	0,210	0,130	0,413	
4. V. porta (unterhalb ihres Eintritts in die V. lienalis)	0,163	0,098	0,065	0,262	0,066	0,216	0,131	0,425	
5. Peripher. Blut (Ohr)	0,194	0,102	0,092	0,268	0,066	0,225	0,158	0,462	
6. Rechter Vorhof	0,206	0,108	0,098	0,405	0,070	0,420	0,168	0,626	10,0

Im Magen und Darm sind große Mengen Ol. olivarum vorhanden. Chylusgefäße sind gefüllt, von milchweißer Farbe.

finden wir im arteriellen Blute, wobei, wenn wir das Blut des rechten Vorhofs mit dem Blute der Arterie vergleichen, eine scharf ausgeprägte Zunahme (auf 100 Proz.) der sogenannten Phosphatid-Fraktion im rechten Vorhof, im Vergleich mit der Arterie, zu beobachten ist; insofern, als die Phosphatid-Fraktion nach *Bang* aus den Phosphatiden und Seifen besteht, und insofern, als der Gehalt des lipoiden P im rechten Vorhof und der Arterie fast gleich ist (Unterschied 8 Proz.); die Zunahme der Phosphatid-Fraktion im rechten Vorhof muß man auf Kosten der Zunahme der Seifen beziehen. Im arteriellen Blute fällt der Seifengehalt stark ab, parallel damit nimmt die Menge des Neutralfettes zu.

Damit wird die Frage nach der Lunge als eines Organs, in dem eine Resynthese des Neutralfettes stattfindet, hervorgehoben.

Bekanntlich nimmt man seit der Zeit der klassischen Untersuchungen (*Radjziewski*, *Perewoznikow*, *Munk*, *Munk* und *Rosenstein*, *Minkowski*, *Pflüger*, *Frank*, *Strauß* u. a.) an, daß das Fett im Darm in Fettsäure und Glycerin gespalten, in der Darmwand resynthetisiert wird und von dort durch die Chylusgefäße in den Ductus thoracicus kommt; nach anderen Autoren (*Ioanovics* und *Pick*, *Bang*) wird ein Teil des Fettes, jedenfalls einige seiner Arten, wie z. B. Lebertran, durch die Vena porta resorbiert und gelangt in die Leber hinein. Jedoch erscheint die Zunahme des Neutralfettes im Ductus thoracicus bzw. der Vena porta bei der Fettbelastung nicht, wie noch *Pflüger* anzeigte, als kategorischer Beweis seiner unmittelbaren Synthese bzw. seines Eintretens aus der Darmwand, denn diese Zunahme kann den Charakter und die Herkunft transporter Gesamtlipämie haben, um so mehr, als die Versuche von *Lesser* gezeigt haben, daß man

bei dem hungernden Hunde ebenso aus dem Ductus thoracicus weiße, an Fetten reiche Lymphe erhalten kann, und namentlich dann, wenn der Darm leer ist. Wie bekannt, findet beim Hungern eine Transportlipämie statt; darauf deuten auch die Versuche von *J.* und *S. Bondi*: bei Hunden, welche 5 bis 9 Tage hungerten, fanden diese Autoren Fettanhäufung in den Epithelien der Darmzotten und Reichtum an Fett in lymphatischen Gefäßen und Blutkapillaren. Außerdem ist es, wie *Bang* betont, in bezug auf Versuche von *Minkowski* wichtig zu bemerken, daß nach der Fütterung mit Erucinsäure in der Lymphe hauptsächlich Tripalmitin, Tristearin und eine unbedeutende Menge Erucin entdeckt wurden. Weiterhin entspricht die Quantität des Neutralfettes, welche in der Lymphe nach der Fütterung mit Fettsäuren gefunden war, nicht der Quantität der eingeführten Fettsäuren; so wurden nach der Einführung von 50,0 g Fettsäuren im Chylus 0,869 g Neutralfett gefunden; nach der Einführung von 100,0 g Fettsäuren 0,917 g, 1,01 g, 1,75 g und 2,09 g Neutralfett, obwohl der Chylus innerhalb vieler Stunden aufgesammelt wurde. Auf diese Weise ist die Frage nach der vollständigen Resynthese des Neutralfettes in der Darmwand als noch nicht ganz bewiesen zu bezeichnen. Unsere Versuche erlauben zu sagen, daß wenigstens ein Teil der Nahrungsfette im Ductus thoracicus als Seife resorbiert wird, und daß in der Lunge eine partielle Resynthese des Neutralfettes[1]) stattfindet.

Resümieren wir unsere Angaben bezüglich der Verteilung des Neutralfettes und Cholesterins im venösen Blute der inneren Organe bei der Olivenölbelastung, so können wir sagen, daß die Leber als jenes Organ erscheint, in welchem die Elimination des Neutralfettes stattfindet, wobei parallel mit der Elimination auch eine Zunahme des Cholesteringehalts im abströmenden Blute stattfindet; die Elimination des Cholesterins findet in der Lunge und Milz statt; in der letzteren wird die Elimination des Cholesterins von der Steigerung des Neutralfettes im abfließenden Blute begleitet; im Blute, welches von der Milz abströmt, kann auch Cholesterinzunahme beobachtet werden; dabei sinkt der Gehalt des Neutralfettes im Vergleich mit seinem Gehalt im zuströmenden Blute. Auf diese Weise treten in der V. hepatica und V. lienalis bestimmte Wechselbeziehungen zwischen Neutralfett und Cholesterin zutage, welche den Charakter der umgekehrten Proportionalität tragen. Es entsteht die Frage, ob in der Milz gleichzeitig mit der Retention des Cholesterins sein Zerfall und aus den Zerfallsprodukten eine Bildung des Neutralfettes stattfindet; ob in der Leber eine Bildung, eine Synthese des Cholesterins aus den Zerfallsprodukten des Neutralfettes (Fettsäuren) ihren Platz hat.

Die vorliegenden Angaben in der Literatur gestatten eine solche Fragestellung. *Thannhauser* äußert sich in seinem Referat über die Chemie des Cholesterins auf der XX. Tagung der deutschen Pathologen folgendermaßen: „Nachdem aber polyterpenartige Ringsysteme in keiner anderen Körperklasse der Organismen vorgebildet sind, muß eine Synthese dieser Ringsysteme aus offenen Kohlenstoffketten erfolgen ... Es liegt die Vermutung sehr nahe, daß die hydrierten Ringe durch Ringschluß aus solchen Komplexen, wie ein solcher in der Seitenkette noch in offenen Ketten in Erscheinung tritt, entstanden sind. Von den Fettsäuren, die zur Synthese dienen könnten,

---

[1]) Ausführlich über die Rolle der Lunge in der Fett- und Lipoidmetabolie in Verbindung mit ihrer lipopeksischen (*Roger* und *Binet*) Funktion in einer der nachfolgenden Mitteilungen.



dürften in erster Reihe die hochgliedrigen Säuren . . . in Frage kommen.“ *Waldvogel* konstatierte bei der Autolyse der Leber eine Cholesterinzunahme; *Reicher* hat bei der Durchströmung des Blutes durch isolierte Leber unter Zusatz von Triolein eine Cholesterinzunahme beobachtet; dasselbe hat auch *Artom* konstatiert. Bei der Autolyse der Leber hungernder Hunde hat *Artom* eine Cholesterinzunahme beobachtet (vgl. unseren Versuch mit Hungern, Tabelle X, wo in der Vena hepatica — parallel mit der Abnahme des Neutralfettes — Zunahme des Cholesterins stattfindet). *Lifschütz* zeigt in seinen Arbeiten „Studien über den Ursprung und die Bildung des Cholesterins und „Zur Kenntnis der chemischen Natur und der Wandlungen des Blutfettes“ an, daß Cholesterin in dem Organismus sich aus der Oleinsäure mittels Oxydation nach folgendem Schema bilden muß:

$$3\,C_{18}H_{34}O_2 + O_2 = 2\,C_{27}H_{46}O + 5\,H_2O.$$

Es ist auch zu bemerken, daß nach *Chalatow* anisotrope Verfettung sich immer auf dem Boden einer isotropen entwickelt. Wenn man sich auf solche Weise auf den Standpunkt stellt, daß die Zunahme des Cholesterins im Blute bei der Belastung mit großen Dosen Olivenöls und bei seiner chronischen Einführung das Resultat seiner Bildung aus Neutralfett durch die Fettsäuren, welche bei dem Zerfall des Neutralfettes sich bilden, ist, so muß nicht nur die Einführung des Olivenöls bzw. Neutralfettes, sondern auch die Einführung der Fettsäuren eine Hypercholesterinämie hervorrufen. Zur Aufklärung dieser Frage wurden Versuche mit Oleinsäurebelastung angestellt.

6. Die Veränderungen der Fette und Lipoide im peripheren Blute und Blute der inneren Organe bei Einführung der Oleinsäure per os.

Tabelle XIV.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide“ Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petroläther-frakt. Proz.
Hund Nr. 7. Gewicht 10 000 g.									
22. II. 1926. Um 10h20′ per os 50,0 acidi oleinici (*Kahlbaum*) eingeführt.									
Präform. . . .	0,135	0,067	0,068	0,340	0,046	0,387	6,68	0,114	0,475
Nach 1½ Std. .	0,135	0,050	0,085	0,404	0,040	0,501		0,125	0,539
„ 3 „ .	0,154	0,063	0,091	0,337	0,075	0,306	7,00	0,166	0,491
„ 5 „ .	0,160	0,071	0,089	0,368	0,039	0,547	10,00	0,128	0,528
„ 7 „ .	0,179	0,120	0,059	0,357	0,056	0,387	11,6	0,117	0,536
Hund Nr. 10. Gewicht 11,300 g.									
21. III. 1926. Per os 50,0 acidi oleinici (*Kahlbaum*) + 10,0 Glycerin eingeführt.									
Präform. . . .	0,150	0,087	0,063	0,356	0,056	0,384	7,84	0,119	0,506
Nach 3 Std. . .	0,161	0,103	0,058	0,398	0,060	0,435		0,118	0,559
„ 5 „ . .	0,154	0,047	0,107	0,325	0,047	0,366	7,64	0,154	0,479
„ 7 „ . .	0,143	0,081	0,062	0,409	0,075	0,414	7,8	0,137	0,552
„ 24 „ . . 22. III. 1926	0,211	0,147	0,064	0,344	0,083	0,234	10,13	0,147	0,555

Tabelle XV.

8. Mai 1926. Hund 18. Gewicht 13800 g.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	Gesamtcholesterin Proz.	Lipoider P mg-Proz.
Präform.	0,117 (0,43)	0,072 (0,25)	0,045 (0,18)	0,080 (0,29)	0,125 (0,37)	6,0

Um 10h wurden per os 50,0 acidi oleinici (*Kahlbaum*) + 5,0 Glycerini puriss. eingeführt.

Um 3h30′ 10 ccm 2proz. Morphiumlösung subkutan.

Um 3h50′ Äthernarkose.

Um 4h Laparotomie; Blut ist entnommen aus:

1. A. femoralis . .	(0,133 0,52)	0,080 (0,31)	0,053 (0,21)	0,103 (0,4)	0,156 (0,61)	4,4
1. V. lienalis . . .	0,130 (0,49)	0,090 (0,33)	0,040 (0,16)	0,067 (0,25)	0,107 (0,41)	7,0
2. V. hepatica . .	0,151 (0,57)	0,060 (0,21)	0,091 (0,36)	0,082 (0,30)	0,173 (0,66)	7,0
3. V. porta . . .	0,142 (0,52)	0,100 (0,35)	0,042 (0,17)	0,081 (0,30)	0,123 (0,47)	6,5
4. Peripheres Blut (Ohr)	0,141 (0,53)	0,061 (0,22)	0,080 (0,31)	0,080 (0,30)	0,160 (0,61)	9,0
5. V. suprarenalis .	0,149 (0,55)	0,092 (0,34)	0,057 (0,21)	0,098 (0,36)	0,155 (0,57)	
6. V. renalis . . .	0,138 (0,52)	0,073 (0,27)	0,065 (0,25)	0,130 (0,45)	0,195 (0,70)	
7. Rechter Vorhof	0,145 (0,65)	0,067 (0,23)	0,077 (0,30)	0,110 (0,41)	0,187 (0,71)	
8. Aorta	0,135	0,083	0,052	0,105	0,157	5,2

Die Chylusgefäße sind gefüllt und von milchweißer Farbe.

Wie aus den angeführten Tabellen ersichtlich ist, wird *die Einführung der Oleinsäure immer von der Cholesterinzunahme* (freien und gebundenen) im Blute auf 30 bis 40 Proz. begleitet; der Gehalt des Neutralfettes im peripheren Blute vergrößert sich ebenfalls, aber viel später als bei Belastung mit Olivenöl; parallel mit Cholesterin vergrößert sich auch der lipoide P; die Abwesenheit des Parallelismus in den Schwankungen des lipoiden Phosphors und der Phosphatid-Fraktion lassen die Frage offen, ob die Schwankungen der Phosphatid-Fraktion das Resultat der Veränderung des Seifengehalts im Blute oder die Folge der Umwandlung der Phosphatidmoleküle sind.

Die Verteilung der Fette und Lipoide in den Venen der inneren Organe (Tabelle XV) zeigt an, daß *die Cholesterinzunahme bei der Oleinsäurebelastung das Resultat seiner Zunahme in Vena hepatica ist.* Im arteriellen Blute wird, ebenso wie bei der Belastung mit Olivenöl, die Zunahme des Neutralfettes im Verhältnis zu seinem Gehalt im rechten Vorhof beobachtet, wobei parallel damit die Cholesterinmenge in der Arterie sich vermindert. Das Zurückhalten des Cholesterins und die gleichzeitige Zunahme des Neutralfettes wird, wie in der Norm, in der Milz beobachtet.

Die Zunahme des lipoiden P wird in der Vena lienalis und hepatica konstatiert. Es ist noch notwendig, die Erhöhung des Neutralfettes in der Vena suprarenalis und die bedeutende Zunahme des gebundenen Cholesterins in der Vena renalis bei Oleinsäurebelastung hervorzuheben.

Auf diese Weise unterstützen und bestätigen die Versuche mit der Einführung der Oleinsäure die Tatsache einer innigen Abhängigkeit zwischen Cholesterin und Neutralfett, welche sich dadurch ausdrückt, daß die Zunahme des Cholesterins mit der Abnahme des Neutralfettes in der V. hepatica insofern verbunden ist, als dabei in der Leber eine Spaltung des Neutralfettes in Fettsäuren stattfindet.

Die Untersuchungen der Phosphatid-Fraktion und des lipoiden P in der V. porta und V. hepatica bei Oleinsäurebelastung zeigen an, daß in der Leber das Zurückhalten der Fettsäuren (Seifen) und die parallele Zunahme des Cholesterins (Tabelle XVI) vor sich geht.

Tabelle XVI.

Hund 13. 20. August 1926. Um 10 Uhr sind per os 50,0 Acid. oleinici (*Kahlbaum*) eingeführt; um 3 Uhr Narkose, Laparotomie.

	Phosphatidfraktion Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Cholesterin Proz.
V. porta	0,420	8,16	0,130
V. hepatica	0,173	9,18	0,160

Insofern als der Gehalt des lipoiden P in der V. hepatica nicht nur sich vermindert, sondern im Gegenteil im Vergleich mit der V. porta sich vergrößert, muß man die Abnahme der Phosphatid-Fraktion in der V. hepatica auf Kosten der Abnahme der Fettsäuren (Seifen) beziehen. Andererseits bestätigen die Versuche mit der Oleinsäurebelastung die Möglichkeit einer partiellen Resynthese des Neutralfettes in der Lunge.

7. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die Einführung des Olivenöls per os ruft bei Hunden eine Zunahme des Neutralfettes im Blute hervor, wobei die Höhe der Zunahme des Neutralfettes von der Menge des eingeführten Öles nicht abhängig ist; die Dosis der letzteren bestimmt nur den Charakter des Verlaufs der Lipämie; es stellen sich namentlich zwei Typen der Lipämie ein: der erste, welcher bei der Einführung der mittleren Dosen des Olivenöls (7,0 bis 10,0 pro Kilogramm) beobachtet wird, charakterisiert sich durch eine hypolipämische Phase, welche sich nach der anfänglichen Zunahme des Neutralfettes einstellt; nach der hypolipämischen Phase tritt wieder die Zunahme des Neutralfettes ein; der zweite Typus der Lipämie, welcher bei der Einführung großer Dosen Olivenöls (10,0 bis 14,0 pro Kilogramm) stattfindet, wird durch das Fehlen der hypolipämischen Phase charakterisiert; die wiederholte (am folgenden Tage) Einführung der mittleren Dosen des Olivenöls kann den Übergang des ersten Typus der Lipämie in den zweiten hervorrufen.

Die Einführung der Oleinsäure per os und Oleinsäure mit Glycerin ruft eine Zunahme des Neutralfettes im Blute hervor, deren Maximum später als bei der Einführung des Olivenöls eintritt.

2. Lipämie, welche bei der Einführung des Olivenöls stattfindet, wird immer von einer Veränderung des Bildes des Cholesterins im Blute begleitet, wobei die Veränderung des Cholesteringehalts sich in bestimmter Abhängigkeit von dem Gehalt des Neutralfettes im Blute befindet, und zwar: bei dem ersten Typus der Lipämie entspricht die Periode der maximalen Zunahme des Neutralfettes im Blute der Abnahme des Cholesterins; dagegen entspricht der hypolipämischen Phase die Zunahme des Cholesteringehalts; bei dem zweiten Typus der Lipämie wird Cholesterinabnahme nicht beobachtet; sein Gehalt im Blute nimmt um 60 bis 100 Proz. zu. Die Veränderung des Cholesterins bei der alimentären Lipämie bezieht sich hauptsächlich auf das freie und nicht gebundene Cholesterin.

3. Die Einführung des Olivenöls per os ruft eine Zunahme des lipoiden Phosphors bzw. der Phosphatide des Blutes hervor.

4. Einführung der Oleinsäure per os ruft eine Cholesterinämie und eine Zunahme des lipoiden P des Blutes hervor.

5. Chronische Einführung des Olivenöls per os ruft nicht Hyperlipämie, sondern Hypercholesterinämie und Phosphatidämie hervor.

6. Die Verteilung des Neutralfettes, Cholesterins und lipoiden P in den Venen zeigt, daß in der Norm das Zurückhalten des endogenen Cholesterins in der Milz und Lunge stattfindet, wobei dieses Zurückhalten des Cholesterins von der Zunahme des Neutralfettes begleitet wird. In den übrigen Venen ist der Cholesteringehalt größer als in dem arteriellen Blute. Die Abnahme des Lipoid-P (im Vergleich mit dem arteriellen Blute) wird in der Vena lienalis, die Zunahme in der Vena suprarenalis, hepatica und renalis konstatiert.

7. Die bei der Belastung mit Olivenöl und Oleinsäure beobachtete Verteilung des Neutralfettes, der Fettsäuren und des Cholesterins in den Venen der inneren Organe zeigt: a) die Abnahme des Neutralfettes und parallele Zunahme des Cholesterins, welche bei der hypolipämischen Phase stattfindet, ist ein Abbild dieser Wechselbeziehungen in der Vena hepatica; b) in dem arteriellen Blute tritt parallel der Abnahme der Fettsäuren (Seifen) und des Cholesterins eine Zunahme des Neutralfettes ein; c) in der V. lienalis, gleichzeitig mit der Abnahme des Cholesterins und Zunahme des Neutralfettes, kann auch der entgegengesetzte Prozeß beobachtet werden: die Cholesterinzunahme und Abnahme des Neutralfettes, welche von dem Stadium der Lipämie abhängig ist; d) die Wechselbeziehungen zwischen Neutralfett und Cholesterin in der V. lienalis ist diesen Wechselbeziehungen in der V. hepatica entgegengesetzt; e) bei der Belastung mit Oleinsäure geht die Zunahme des

Cholesterins in der V. hepatica parallel mit dem Zurückhalten der Fettsäuren (Seifen) in der Leber vor sich; f) die Zunahme des lipoiden P bei der Belastung mit Oleinsäure ist ein Abbild seiner Zunahme in der V. lienalis und V. hepatica.

8. Die Angaben, welche im Punkt 7 angeführt sind, erlauben uns zuzulassen, daß: a) ein Teil des Fettes in den Ductus thoracicus als Fettsäuren (Seifen) gelangt, welche in der Lunge im Neutralfett synthetisiert werden; b) von der Leber Cholesterin ins Blut gelangt; c) in der Milz das Zurückhalten des Cholesterins und eine Abgabe des Neutralfettes stattfinden kann, ebenso wie der umgekehrte Prozeß, das Zurückhalten des Neutralfettes und die Abgabe des Cholesterins.

9. Die erhaltenen Angaben, die auf bestimmte Wechselbeziehungen zwischen dem Neutralfett und Cholesterin hinweisen, welche hauptsächlich durch die Leber, Milz und Lunge bestimmt werden, erlauben die Vermutung über die Möglichkeit des Übergangs des Cholesterins in Neutralfett (in der Milz) und über die Bildung des Cholesterins aus dem Neutralfett durch die Fettsäuren (hauptsächlich in der Leber) auszusprechen.

10. Insofern, als die Untersuchung der Fette und Lipoide in den Venen der inneren Organe in den Bedingungen des akuten Versuchs nicht als einziger, entscheidender und endgültiger Beweis der angezeigten Ergebnisse erscheinen kann, ist es notwendig, die weiteren Untersuchungen in dieser Richtung anzustellen, über deren Resultate in den nächsten Mitteilungen gesprochen wird.

Literatur.

Aschoff, Ergebn. d. inn. Med. u. Kindh. **26**, 1924; Vorträge über Pathologie, Jena 1925. — *Abelous* und *Soula*, C. r. d. soc. biol. **83**, 1920; Arch. int. de phys. **18**, 1921. — *Artom*, ebendaselbst **20**, **22**, **23**. — *Arndt*, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **54**, 1927. — *N. N. Anitschkow*, Deutsche med. Wochenschr. Nr. 16, 1923. — *Agandjanianz*, Medico-biolog. Journ. **1**, 1926 (russisch). — *Bacmeister*, diese Zeitschr. **26**, 223, 1910. — *Bang*, ebendaselbst **91**, 86, 1918; Ergebnisse d. Phys. **6**, 1907. Chem. u. Biochem. d. Lipoide. Wiesbaden 1911. — *Bloor*, Journ. of biol. Chem. **49**, 1921. — *Brinkmann* und *v. Dam*, diese Zeitschr. **108**, 35, 1920. — *Bogomolez*, „Konstitution u. Mesenchym" (russisch). — *Bing* und *Heckscher*, ebendaselbst **149**. — *Bondi*. Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. **6**, 1909. — *Bürger* und *Beumer*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **71**, 1913. — *Bürger*, Münch. med. Wochenschr. S. 403, 1922. — *Chalatow*, „Die anisotrope Verfettung". Jena 1922. — *Chauffard*, Sém. méd. **16**, 1912; Presse méd. T. **30**, 1922; C. r. soc. biol. 1911, 1912, 1913. — *Embden* und *Michaud*, diese Zeitschr. **11**, 13, 1908. — *Feigl*, ebendaselbst **86**, 1, 1918. — *Fleisch*, ebendaselbst **177**, 375, 1926. — *Forster*, ebendaselbst **146**, 562, 1924. — *Hueck* und *Wacker*, ebendaselbst **100**, 84, 1919. — *Hueck*, Verh. d. deutsch. Pathol. Ges. 1925. — *Fränkel*, Handb. d. biol. Arbeitsmethod. I, **6**, H. 1, 1922. — *Iwatsuru*, Pflügers Arch. **202**, **214**. — *Joanorovicz* und *Pick*, Verh. d. deutsch. Pathol. Ges. 1910. — *Klemperer* und *Umber*, Zeitschr. f. klin.

Med. **61**, 1907. — *Leva*, Berl. Klin. Wochenschr. Nr. 21, 1909. — *Lifschütz*, Zeitschr. f. phys. Chem. **55**, 117. — *Munk*, *Munk* und *Rosenstein*, Virchows Arch. **80**, **95**, **122**, **123**; Pflügers Arch. **75**. — *Minkowski*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **21**. — *Maas*, diese Zeitschr. **144**, 379, 1924. — *Neisser* und *Bräuning*, Zeitschr. f. exper. Pathol. und Ther. **4**, 1907. — *Overton*, Studien über Narkose. Jena 1910. — *Pflüger*, Pflügers Arch. **80**, **81**, **82**, **85**, **88**, **89**. — *Rothschild*, Zieglers Beitr. **60**, 1915. — *Soper*, ebendaselbst. — *Roger*, „Questions actuelles de Biologie medicale". Paris 1922. — *Sakai*, diese Zeitschr. **62**, 387, 1914. — *Thannhauser*, Verh. d. deutsch. Pathol. Ges. 1925 — *Versé*, ebendaselbst — *Waldvogel*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **82**, 1905; übrigens zit. nach *Aschoff*, *Bang*, *Hueck*, *Versé*, *Abderhalden*, Lehrb. d. phys. Chem. 1922; Oppenheimers Handb. d. Biochem. VIII, 1925; *Fischler*, „Physiologie und Pathologie der Leber"; *Joel*, Klin. Wochenschr. Nr. 43, 1924; *Rubner*, ebendaselbst Nr. 39, 1925.

Studien über Fett- und Lipoidstoffwechsel.

II. Mitteilung:

Über alimentäre Cholesterinämie.

Von

Samuel Leites (Charkow).

[Aus dem Laboratorium für pathologische Physiologie des Medizinischen Instituts zu Charkow (Ukraine).]

(Eingegangen am 12. Februar 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

In unserer ersten Mitteilung[1]) über Blutfett- und Lipoidspiegel bei Belastung mit Olivenöl bzw. Oleinsäure wurde gezeigt, daß diese Belastung unter gewissen Umständen zu deutlich ausgeprägter Cholesterinämie führt, und daß die letztere endogenen Ursprungs ist und mit den Umwandlungen des Neutralfettes bzw. der Fettsäuren hauptsächlich in der Leber und Milz verbunden ist. Es wurde einseitig darauf hingewiesen, daß Lungen und Milz als Anhaltspunkte für endogenes Cholesterin erscheinen.

Zum weiteren Studium der Frage nach dem Cholesterinmetabolismus dienten Beobachtungen über das Schicksal des exogen eingeführten Cholesterins.

Seit den Untersuchungen von *Gardner* und seinen Mitarbeitern wird angenommen, daß der Gehalt an Cholesterin sowohl im Körper als auch im Blute von der Menge des exogen eintretenden Cholesterins abhängt. Von diesem Standpunkt wird der niedrige Gehalt an Cholesterin bei „Unterernährung“ während des Krieges (*Rosenthal* und *Patrzek*), sowie bei der Bevölkerung von Holländisch-Indien (*de Langen*) gedeutet. Auch in Tierexperimenten (*Leupold* an Kaninchen, *Gremjatschkin* an Hunden) konnten Senkungen bei cholesterinarmer Kost erzielt werden. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob diese Cholesterinabnahme infolge von Abwesenheit desselben in der Nahrung erscheint, oder als Resultat einer Avitaminose betrachtet werden muß, um so mehr, als andere Angaben (*Strathmann-Herrweg* bei Säuglingen, *Stepp* bei Hunden, *Strauß*) keine Blutcholesterinsenkung bei voller Lipoidabwesenheit in der Nahrung beobachtet haben.

[1]) Diese Zeitschr. **184**, 273, 1927.

Andererseits hat nicht immer die Cholesterineinführung durch die Nahrung eine Cholesterinämie zur Folge (*Cabanès* und *Rouzard, Ssokolow, Mjassnikow*); es besteht kein Parallelismus zwischen der Menge des eingeführten Nahrungscholesterins und der Cholesterinzunahme des Blutes. Untersuchungen über die Cholesterinbilanz (*Beumer* und *Lehmann*) zeigen, daß die letztere unabhängig vom Nahrungscholesterin ist. Es ist somit keine bestimmte Abhängigkeit oder Proportionalität zwischen dem Cholesterin der Nahrung und dem Grade der Cholesterinämie festgestellt; es scheint, daß die bloße Cholesterinanwesenheit in der Nahrung an und für sich ungenügend ist, um eine Hypercholesterinämie hervorzurufen; noch andere bestimmte Umstände sind notwendig, damit das Nahrungscholesterin eine Blutcholesterinzunahme zur Folge hat.

Am wichtigsten erscheint die Tierart: während die einmalige Cholesterinzufuhr bei Omni- und Carnivoren die Menge desselben im Blute unter gewissen Umständen vergrößert, was jedoch schnell vorübergeht, ist eine dauernde Cholesterinfütterung notwendig, um eine stabile Cholesterinämie bei Herbivoren hervorzurufen (*Wacker* und *Hueck, Weltmann* und *Biach, Versé, N. N. Anitschkow, Chalatow, Ssokolow* u. a.). Es ist weiter von großer Bedeutung die Anwesenheit von Galle (Desoxycholsäure) (*Schönheimer*), Pankreassaft (*H. Mueller*), Fettsäuren (*Sano*), welche die Cholesterinresorption unterstützen, und endlich ist die Anwesenheit von Fetten, in denen das Cholesterin gelöst ist, die notwendige Bedingung für das Auftreten der alimentären Cholesterinämie.

Hoppe-Seylers bekannter Ausspruch: „Die Fette bahnen dem Cholesterin den Weg“, wird durch die Angaben von zahlreichen Autoren bestätigt. *Bang* fütterte Hunde mit Fleisch, dem Cholesterin zugemischt war, und erhielt eine unbedeutende Hypercholesterinämie, fütterte er dagegen Fleisch und Fett und Cholesterin, so bekam er eine bedeutende Cholesterinämie. *Bangs* Angaben bestätigte auch *Arndt. Levites* fand bei einem Ileococcalfistelhund, daß das mit Brot verfütterte Cholesterin beinahe vollständig wieder ausgeschieden wird. Auch bei Kaninchen erscheint die Cholesterinämie nur in den Fällen, wenn genügend Fett anwesend ist (*Versé, Anitschkow, Chalatow* u. a.); durch trockene Cholesterinzufuhr kann man keine erhöhte Cholesterinablagerung erzielen (*Knack*). Auch beim Menschen wird nach *Thannhauser* Cholesterin erst resorbiert, wenn es in Öl gelöst wird.

Nachdem wir die Tatsache[1]) festgestellt hatten, daß Fett bzw. Fettsäuren an und für sich Hypercholesterinämie hervorrufen, mußte die Frage gelöst werden, ob das Fett nur deshalb für das Auftreten der alimentären Cholesterinämie notwendig ist, weil dasselbe als Cholesterinlösungsmittel die Cholesterinresorption fördert, oder die sogenannte exogene alimentäre Cholesterinämie in ihrem Wesen bloß eine endogene lipogenetische darstellt, deren Ursache nicht im Cholesterin, sondern im Fett der Nahrung liegt.

Zu diesem Zwecke haben wir Versuche an Hunden angestellt, denen Cholesterin in Olivenöl per os eingeführt wurde. Die eingeführte Cholesterinmenge betrug 0,2 bis 0,5 pro Kilogramm, das Olivenöl in denselben Dosen, wie in den Versuchen mit alimentärer Lipämie (7,0 bis 14,0 pro Kilogramm).

[1]) Siehe I. Mitteilung.



Die Versuchsanordnung und Methodik ist dieselbe wie in den Versuchen mit der alimentären Lipämie (vgl. I. Mitteilung). Im ganzen wurden zehn Versuche an acht Hunden ausgeführt.

Tabelle I.

	Petrolätherfraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkoholfraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamtcholesterin Proz.	Alkohol + Petrolätherfrakt. Proz.
16. I. 1926. Hund Nr. 4. Gewicht 9 kg.									
Präform	0,110	0,058	0,052	0,237	0,069	0,171		0,121	0,347
9h30' wurden per os 2 g Cholesterin in 30,0 Ol. olivar. eingeführt.									
Nach 1 1/2 Std. .	0,122	0,062	0,060	0,263	0,069	0,210		0,129	0,385
„ 3 „ .	0,120	0,070	0,050	0,293	0,084	0,216		0,134	0,413
„ 5 „ .	0,111	0,047	0,064	0,306	0,091	0,216		0,155	0,417
„ 7 „ .	0,125	0,036	0,089	0,290	0,069	0,252		0,158	0,415
„ 24 „ .	0,140	0,075	0,065	0,237	0,069	0,171		0,134	0,377
17. XII. 1925. Hund Nr. 5. Gewicht 7,15 kg.									
Präform	0,114	0,056	0,058	0,293	0,064	0,270		0,120	0,407
9h45' wurden per os 1,5 g Cholesterin in 25,0 Ol. olivar. eingeführt.									
Nach 1 1/2 Std. .	0,136	0,088	0,048	0,297	0,068	0,267		0,116	0,433
„ 3 „ .	0,157	0,059	0,098	0,300	0,071	0,264		0,169	0,457
„ 5 „ .	0,116	0,056	0,060	0,318	0,084	0,252		0,144	0,434
„ 7 „ .	0,119	0,061	0,058	0,281	0,068	0,240		0,126	0,400
3. III. 1926. Hund Nr. 7, Gewicht 9 kg.									
Präform	0,101	0,048	0,053	0,355	0,065	0,360	11,5	0,118	0,456
9h50' wurden per os 5 g Cholesterin in 100,0 Ol. olivar. eingeführt.									
Nach 3 Std. . .	0,182	0,072	0,110	0,423	0,101	0,366		0,211	0,605
„ 5 „ . .	0,196	0,160	0,036	0,336	0,093	0,222		0,129	0,532
„ 7 „ . .	0,178	0,138	0,040	0,412	0,060	0,456	12,5	0,100	0,590
„ 24 „ . .	0,226	0,093	0,133	0,420	0,151	0,225	13,8	0,284	0,646
24. II. 1926. Hund Nr. 8, Gewicht 14,2 kg.									
Präform	0,152	0,091	0,061	0,247	0,046	0,252	8,34	0,107	0,399
9h45' wurden per os 5 g Cholesterin in 100,0 Ol. olivar. eingeführt.									
Nach 3 Std. . .	0,175	0,143	0,032	0,332	0,093	0,252	8,35	0,125	0,507
„ 5 „ . .	0,193	0,093	0,100	0,266	0,046	0,276	8,78	0,146	0,459
„ 7 „ . .	0,216	0,160	0,056	0,280	0,044	0,303	9,20	0,100	0,496
„ 24 „ . .	0,160	0,090	0,070	0,266	0,046	0,276	8,64	0,116	0,422

Wie aus der Tabelle I zu ersehen ist (in drei anderen Versuchen ähnliche Ergebnisse), ruft die Einführung des Cholesterins in Olivenöl eine Cholesterinzunahme im Blute bis zu 30 bis 90 Proz. hervor, und zwar 3 bis 5 Stunden nach der Einführung, ohne daß der Erhöhungsgrad von der Cholesterinmenge abhängt. Jedoch, wie aus unseren Versuchen über alimentäre Lipämie (I. Mitteilung) zu ersehen ist, gibt die Einführung nur des Olivenöls und der Oleinsäure allein auch dieselbe Cholesterinzunahme; bei der Zusammenstellung der Cholesterinveränderungen im Blute bei der

Belastung mit Cholesterin + Olivenöl, Olivenöl und Oleinsäure findet man hinsichtlich der Steigerung der Blutcholesterinkurve fast keinen Unterschied unter denselben; der Unterschied ist im Rahmen der individuellen Schwankungen (Kurven Abb. 1, 2, 3).

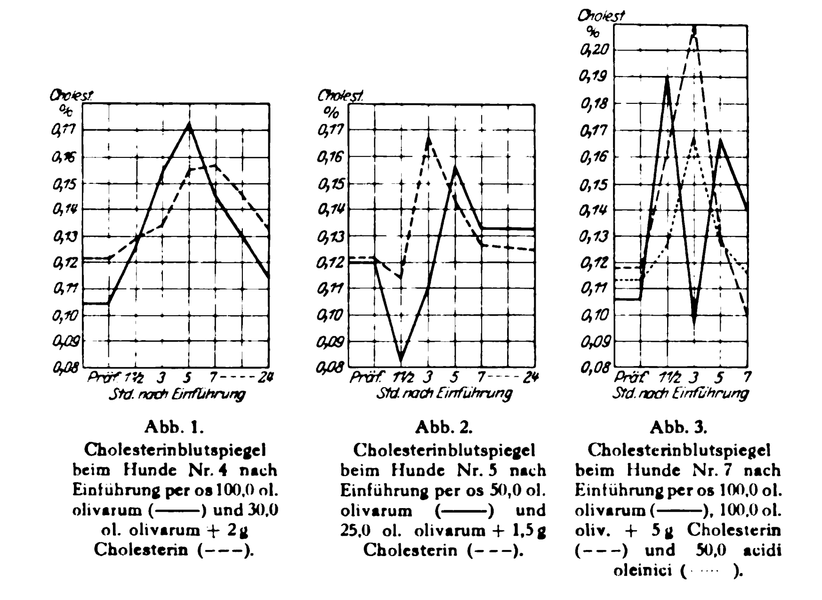


Abb. 1. Cholesterinblutspiegel beim Hunde Nr. 4 nach Einführung per os 100,0 ol. olivarum (———) und 30,0 ol. olivarum + 2 g Cholesterin (- - -).

Abb. 2. Cholesterinblutspiegel beim Hunde Nr. 5 nach Einführung per os 50,0 ol. olivarum (———) und 25,0 ol. olivarum + 1,5 g Cholesterin (- - -).

Abb. 3. Cholesterinblutspiegel beim Hunde Nr. 7 nach Einführung per os 100,0 ol. olivarum (———), 100,0 ol. oliv. + 5 g Cholesterin (- - -) und 50,0 acidi oleinici (·····).

Also, *Cholesterin + Olivenölbelastung verursacht dieselben Veränderungen von Fett und Lipoiden des Blutes wie diejenigen mit Olivenöl allein*, und zwar: die Einführung von mittleren Dosen des Olivenöls + Cholesterin ruft eine Zunahme des Neutralfettes nach 1½ bis 3 Stunden, dessen Senkung nach der fünften bis siebenten Stunde, und das sekundäre Ansteigen nach 7 bis 24 Stunden hervor (Hunde Nr. 4, 5, 8); die Veränderungen des Blutcholesterins befinden sich in bestimmten Verhältnissen zu den Schwankungen des Neutralfettes. Die maximale Cholesterinzunahme entspricht der hypolipämischen Phase, die minimale derjenigen der hyperlipämischen. Die Einführung von großen Dosen des Olivenöls + Cholesterin ruft eine allmähliche Zunahme des Neutralfettes ohne hypolipämische Phase hervor; die Cholesterinzunahme ist in diesem Falle etwas größer als bei Einführung von mittleren Dosen des Olivenöls. In zwei Fällen aus sieben Versuchen haben wir eine ziemlich große Cholesterinzunahme (100 bis 150 Proz.) 24 Stunden nach der Einführung beobachtet, was bei der Einführung des Olivenöls allein nicht stattgefunden hat.

Was nun den Zusammenhang zwischen freiem und gebundenem Cholesterin anbetrifft, so tritt die Hypercholesterinämie gewöhnlich als Folge der Zunahme des freien als auch gebundenen Cholesterins auf; die bei der Belastung auftretende Senkung des freien Cholesterins wird von der Zunahme derjenigen des gebundenen begleitet. Ähnlich wie bei der Belastung mit Olivenöl allein hat die Einführung von Olivenöl + Cholesterin eine geringe Zunahme (max. 20 bis 30 Proz.) des lipoiden P bzw. der Phosphatide zur Folge.

Da laut dem oben Gesagten die exogene Einführung von Cholesterin den Verlauf der alimentären Lipocholesterinämie nicht beeinflußt, so muß dessen Ausscheidung aus dem Körper oder dessen Fixation in bestimmten Organen bzw. Geweben vorausgesetzt werden.

Indem überhaupt die Ausscheidung des Cholesterins durch die Galle angenommen wird, stellen wir Versuche über den Cholesteringehalt der Galle während alimentärer Lipämie bzw. Cholesterinämie an. Die Versuche[1]) zeigten, daß die Cholesterinmenge in der Galle bei der Belastung mit Cholesterin + Olivenöl dieselbe wie bei der Belastung mit Olivenöl allein ist. Als Beispiel wird einer von den Versuchen (Tabelle II) angeführt.

Tabelle II.

10. November 1926. Hund Nr. 2, 10 kg; Operation der Anlegung von Gallenblasefistel; der Choledochus zwischen zwei Ligaturen durchgeschnitten.

Datum	Zeit	Gallenmenge ccm	Cholesterinmenge der Galle *) mg	Cholesterinmenge der Galle *) mg-Proz.	Anmerkungen
27. XI. 1926	7h45' bis 9h45'	8,0	1,2	15,0	Norm. nüchtern
10h morgens wurden per os 5 g Cholesterin in 100,0 Ol. olivar. eingeführt.					
	10h5' bis 12h5'	10,0	1,55	15,5	Stündlich 5 ccm Galle per os eingeführt
	12 5 „ 2 5	10,0	1,50	15,0	
	2 5 „ 4 5	9,0	1,35	15,0	
	Total während 6 Std.	*29,0*	*4,40*		
29. XI. 1926	8h bis 10h	9,0	1,08	12,0	Norm. nüchtern
10h morgens wurden per os 100,0 Ol. olivar. eingeführt.					
	10h bis 12h	10,0	1,5	15,0	Stündlich 5 ccm Galle per os eingeführt
	12 „ 2	10,0	1,56	15,6	
	2 „ 4	9,0	1,35	15,0	
	Total während 6 Std.	*29,0*	*4,41*		

*) Bestimmung des Cholesterins nach *Bloor, Pelkan* und *Allen.*

Auch die Cholesterinmenge der Galle pro 24 Stdn. ist bei Belastung mit Olivenöl + Cholesterin dieselbe, wie bei Belastung mit Olivenöl allein. Das exogen eingeführte Cholesterin wird also während der Lipocholesterinämie von der Galle nicht ausgeschieden; es muß nun der Punkt, das Gewebe bestimmt werden, wo das Cholesterin nach seiner Resorption fixiert bleibt. Es wurden in dieser Richtung Versuche mit Bestimmung von Neutralfett, Cholesterin und Phosphatide in den Venen der inneren Organe bei Belastung mit Cholesterin von uns unternommen. Die Methodik, sowie die Versuchsanordnung ist dieselbe, wie bei Versuchen von Fett- und Lipoidverteilung in den Venen bei Belastung mit Ol. olivarum bzw. Oleinsäure (vgl. I. Mitteilung). Es wurden drei Versuche ausgeführt (Tabelle III und IV); der dritte nicht angeführte Versuch gab ähnliche Ergebnisse wie der Versuch in Tabelle IV.

---

[1]) Ausführlich in einer von den nachfolgenden Mitteilungen.

Tabelle III. 12. April 1926. Hund Nr. 15, Gewicht 7,3 kg.

	Petroläther-fraktion	Neutralfett	Freies Cholesterin	Alkohol-fraktion	Gebundenes Cholesterin	„Phosphatide"	Lipoider P	Gesamt-cholesterin	Alkohol + Petroläther-frakt.
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	mg-Proz.	Proz.	Proz.
Präform	0,145	0,092	0,053	0,211	0,052	0,177		0,105	0,356

Um 9h15' wurden per os 4 g Cholesterin in 80,0 Ol. olivar. eingeführt.
Um 1 45 Morphium subkutan (5 ccm 2proz. Lösung).
Um 2 Äthernarkose.
Um 2 15 Laparotomie; das Blut ist entnommen aus:

1. A. femoralis .	0,351	0,294	0,057	0,304	0,097	0,195	6,5	0,154	0,655
2. V. lienalis . .	0,466	0,320	0,146	0,381	0,102	0,300	9,16	0,278	0,847
3. V. hepatica .	0,320	0,260	0,060	0,405	0,112	0,309		0,172	0,725
4. V. porta . . .	0,318	0,256	0,062	0,334	0,103	0,228	6,14	0,165	0,652
5. V. femoralis .	0,316	0,227	0,089		0,090			0,179	
6. Peripher. Blut (Ohr)	0,321	0,232	0,089	0,346	0,092	0,273		0,181	0,667
7. Recht. Vorhof	0,361	0,279	0,082	0,533	0,090	0,561	7,2	0,172	0,894

Chylusgefäße gefüllt, milchweiß.

Tabelle IV. 15. Juni 1926. Hund 23, Gewicht 10,5 kg.

	Petroläther-fraktion	Neutralfett	Freies Cholesterin	Alkohol-fraktion	Gebundenes Cholesterin	„Phosphatide"	Lipoider P	Gesamt-cholesterin	Alkohol + Petroläther-frakt.
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	mg-Proz.	Proz.	Proz.
Präform	0,158	0,100	0,058	0,369	0,076	0,351	8,6	0,134	0,527
	(0,58)	(0,37)	(0,21)	(1,43)	(0,25)	(1,48)	(30,0)	(0,46)	(2,01)

Um 9h25' wurden per os 5 g Cholesterin in 100,0 Ol. olivar. eingeführt.
Um 2 subkutan Morphium (10 ccm 2proz. Lösung).
Um 2 10 Äthernarkose.
Um 2 15 Laparotomie; das Blut ist entnommen aus:

1. A. lienalis . .	0,169	0,160	0,009	0,186	0,056	0,129	6,3	0,065	0,355
	(0,66)	(0,60)	(0,06)	(0,73)	(0,20)	(0,54)	(22,8)	(0,26)	(1,39)
2. V. lienalis . .	0,183	0,089	0,094	0,356	0,070	0,345	6,49	0,164	0,539
	(0,62)	(0,28)	(0,34)	(1,21)	(0,22)	(1,23)	(22,8)	(0,56)	(1,83)
3. V. hepatica .	0,169	0,089	0,080	0,360	0,054	0,396	7,4	0,134	0,529
	(0,59)	(0,31)	(0,28)	(1,24)	(0,19)	(1,35)	(26,6)	(0,47)	(1,83)
4. V. porta . .	0,159	0,110	0,049	0,395	0,056	0,444		0,105	0,554
	(0,61)	(0,41)	(0,20)	(1,56)	(0,20)	(1,81)		(0,40)	(2,17)
5. V. suprarenal	0,182	0,100	0,082	0,326	0,085	0,266		0,167	0,508
	(0,67)	(0,36)	(0,30)	(1,19)	(0,31)	(0,96)		(0,62)	(1,86)
6. V. femoralis .	0,169	0,095	0,074		0,051		7,5	0,125	
	(0,63)	(0,33)	(0,30)		(0,14)		(27,2)	(0,44)	
7. Peripher. Blut (Ohr)	0,192	0,054	0,138	0,394	0,040	0,483	8,7	0,178	0,586
	(0,70)	(0,18)	(0,52)	(1,45)	(0,13)	(1,83)	(30,0)	(0,65)	(2,15)
8. Recht. Vorhof	0,242	0,081	0,161	0,429	0,075	0,444	6,8	0,236	0,671
	(0,87)	(0,30)	(0,57)	(1,53)	(0,29)	(1,53)	(24,0)	(0,86)	(2,40)
9. Aorta abdom.	Dasselbe wie Arteria lienalis								

Die Zahlen in Klammern zeigen die Fett- bzw. Lipoidmenge auf festen Rückstand (nach *Bang*) berechnet. — Chylusgefäße gefüllt, milchweiß.

Die Untersuchungen von *Howard Mueller* an einem Hunde mit Fistel des D. thoracici zeigten, daß größenteils das Cholesterin aus dem Darm in D. thoracicus einfließt; nach *Nedzwedski*, *Mjassnikow* und *Iljinsky* wird ein Teil des Cholesterins aus dem Darm in V. porta resorbiert, jedoch ist der Unterschied in dem Cholesteringehalt zwischen der Arteria und V. porta bei *Nedzwedski* (Arteria bis 133 mg-Proz. Cholesterin, V. porta bis 138 mg-Proz. Cholesterin) und *Mjassnikow* und *Iljinsky* (Unterschied zwischen V. duodenalis und V. des Ohres = 0,15 bis 0,25 Prom.) so gering, daß er sich in den Grenzen des Methode- und Versuchsfehlers befindet. Unsere Versuche (Tabellen III und IV) zeigen keinen größeren Cholesteringehalt in der V. porta als in den übrigen Venen. Was den rechten Vorhof anbetrifft, so ist dessen Cholesteringehalt nicht weniger als in anderen Venen in einem Versuch (Tabelle III), und übertrifft ziemlich viel die Cholesterinmenge von anderen Venen in zwei Versuchen (der eine von denselben Tabelle IV). Diese Tatsache überzeugt uns darin, daß der größte Teil von exogen eingeführtem Cholesterin aus dem Darm durch D. thoracicus in den rechten Vorhof eintrifft. Bei dem Vergleich der Cholesterinmenge im rechten Vorhof und in dem arteriellen Blute wurde eine starke Senkung des Cholesterins in der Arteria beobachtet, welch letztere ihrerseits cholesterinärmer als die Venen sind.

Das exogen eingeführte Cholesterin bleibt also an den Lungen fixiert; das alimentäre Cholesterin teilt somit das Schicksal des endogenen Cholesterins (vgl. I. Mitteilung). Es ist dabei zu bemerken, daß nach morphologischen Untersuchungen von *Kawamura* und *Nakanoin* bei exogenalimentärer Cholesterinzufuhr beim Hunde eine Cholesterinspeicherung in den Epithelzellen der Bronchiolen und beim Hunde und Kaninchen auch zahlreiche cholesterinhaltige Zellen im Sputum gefunden wurden.

Auch Versuche mit intravenöser Cholesterineinführung bestätigen, daß das exogene Cholesterin an den Lungen fixiert wird. Bei der Einführung von kolloidaler Lösung[1]) des Cholesterins in die Vena jugularis wird dessen Zunahme in dem arteriellen Blute nicht beobachtet; es wird im Gegenteil eine gewisse Abnahme des Cholesteringehalts notiert (Tabelle V).

Tabelle V.

Hund Nr. 29. Gewicht 10 kg. Arteria femoralis (ohne Narkose) separiert.

	Cholesterin in Arteria femoralis		
	Frei Proz.	Gebunden Proz.	Gesamt Proz.
Vor der Injektion	0,057	0,060	0,117
Im Moment und sofort nach Einführung in V. jugularis von 5 ccm 2 proz. kolloidaler Cholesterinlösung	0,051	0,054	0,105

Unsere Ergebnisse berechtigen uns also zu dem Schluß, *daß die sogenannte exogene alimentäre Cholesterinämie in Wirklichkeit eine endogene, lipogenetische darstellt.*

---

[1]) Nach *Keeser* (diese Zeitschr. **154**, 321, 1924) vorbereitet: 10 proz. Cholesterinalkohollösung wird langsam, tropfenweise zu siedendem Aqua dest. hinzugefügt; der Alkohol wird nachher abgedampft.

Die Verteilung von Fett und Lipoiden in den Venen der inneren Organe bei Belastung mit Olivenöl + Cholesterin ist fast dieselbe wie bei der Belastung mit Olivenöl allein. Im Vergleich mit dem rechten Vorhof finden wir in der Arterie einseitig mit der Abnahme der Seifenmenge [die scharfe Abnahme (200 bis 250 Proz.) von Phosphatidfraktion (Phosphatide + Seifen nach *Bang*) ist durch die Abnahme der Seifen bedingt, weil der Lipoid-P nicht parallel sinkt] eine parallel verlaufende Zunahme von Neutralfett, welche Tatsache dafür spricht (vgl. I. Mitteilung), daß in den Lungen eine teilweise Resynthese des Neutralfettes aus den in den Lungen aus D. thoracicus eingegangenen Fettsäuren (Seifen) stattfindet. Was nun den Cholesteringehalt im Venenblut anbetrifft, so enthält dasselbe immer mehr Cholesterin als die Arterie, ähnlich wie in den Versuchen mit Einführung von Olivenöl und Oleinsäure.

Zwei Ursachen können die Cholesterinzunahme im Venenblut bewirken: entweder Mobilisierung, Ausschwemmung desselben aus den Geweben durch das Neutralfett, oder dessen Neubildung, Synthese in Geweben. Die Cholesterinzunahme im Venenblut kann jedoch kaum mit dessen Ausschwemmung verbunden werden, insofern als der Cholesteringehalt im Venenblut bei verschiedenem Neutralfettgehalt in den Venen fast unverändert bleibt. So z. B., trotzdem der Gehalt von Neutralfett in den Venen des Hundes Nr. 15 (Tabelle III) um 150 bis 200 Proz. mehr als in denselben des Hundes Nr. 23 (Tabelle IV) ist, befindet sich der Unterschied in der Cholesterinmenge in den Venen der beiden Hunde in den Grenzen der physiologischen Schwankungen. Andererseits, im Falle einer wirklichen Cholesterinauswaschung, würden wir die größte und beständigste Zunahme des Cholesterins in den Venen, welche vom Hauptdepot desselben Blut sammeln, und zwar Gland. suprarenalis und Unterhautgewebe, d. h. in Vena suprarenalis und in V. femoralis beobachten; dagegen wird kein Überwiegen des Cholesteringehalts als beständige Erscheinung im Vergleich mit anderen Venen weder in V. femoralis noch in V. suprarenalis bei Belastung mit Olivenöl + Cholesterin bzw. Oleinsäure beobachtet. Die von uns angegebenen bestimmten Gegenverhältnisse zwischen Neutralfett und Cholesterin in den Versuchen mit Olivenölbelastung (vgl. I. Mitteilung), welche ihren Ausdruck darin finden, daß die Cholesterinzunahme in den Venen der Abnahme von Neutralfett in denselben entspricht, was am deutlichsten in der V. hepatica zu sehen ist, sowie Versuche mit Oleinsäurebelastung zeigen, wie von uns in der I. Mitteilung betont worden ist, die Möglichkeit von Cholesterinbildung aus Neutralfett durch Fettsäuren, um so mehr, als die Frage über die Möglichkeit der Cholesterinsynthese in dem Tierkörper als positiv gelöst betrachtet werden kann.

Thannhauser und *Schaber* fanden eine geringe Zunahme (10,7 Proz.) des gesamten Cholesteringehalts im Ei während der Entwicklung, was aber von anderen Forschern (*Mendel* und *Leavenworth*, *Ellis* und *Gardner*, *Beumer*) verneint wird. Immerhin scheint schon an diesen Versuchen beachtenswert, daß von keinem der Autoren eine Abnahme des Cholesteringehalts festgestellt werden konnte, also eine Zerstörung des Cholesterins während der Entwicklung nicht stattfindet. Neuerdings sind aber einwandfreie Beweise dafür beigebracht worden, daß der Organismus des Menschen und der Hunde zu einer Cholesterinsynthese fähig sein muß. *Wacker* und *Beck*, *Gamble* und *Blackfan*, *Beumer* haben an Kindern, *Gardner* und *Fox*, *Beumer*, *Thannhauser* an Erwachsenen festgestellt, daß die Cholesterinbilanz bei fett- und cholesterinhaltiger Kost negativ ist. Bei der Unter-

suchung über Gegenverhältnisse zwischen Nahrungscholesterin und Chollesteringehalt im Körper wachsender Tiere haben *Dezani* und *Cataretti* an Kaninchen, *Sisto* an Mäusen, *Beumer* und *Lehmann* an Hunden eine starke Cholesterinzunahme im wachsenden Tierkörper (*Beumer* und *Lehmann* um 30mal so groß) im Vergleich mit dem zugeführten Cholesterin festgestellt. Diese Ergebnisse veranlassen *Hueck* (XX. Tagung der deutschen Pathologischen Gesellschaft) zu dem Schlusse, daß „sich wohl an der Tatsache der Cholesterinsynthese für den tierischen Organismus nicht mehr zweifeln läßt“.

Also, ohne die Möglichkeit von Cholesterinzunahme in den V. femoralis und suprarenalis auf Kosten deren Auswaschung, Mobilisation aus dem Depot auszuschließen, betonen wir die von uns in der I. Mitteilung ausgesprochene Vermutung, daß die Cholesterinzunahme in den V. hepatica und lienalis bei der Belastung mit Olivenöl bzw. Olivenöl + Cholesterin als Folge von Cholesterinbildung in der Milz und Leber aus dem Neutralfett durch Fettsäuren betrachtet werden kann.

Hinsichtlich der Phosphatide bzw. des Lipoid-P können wir, ähnlich wie in den Versuchen mit Oleinsäure- und Olivenölbelastung, deren Zunahme in dem Venenblut im Vergleich zu dem arteriellen feststellen; es muß auch betont werden, daß keine entsprechenden Verhältnisse zwischen Lipoidphosphorzunahme und Phosphatidfraktion vorhanden sind, indem die letztere viel mehr als man im Vergleich zur Zunahme des lipoiden P erwarten könnte, zunimmt. Diese Tatsache muß scheinbar einerseits mit der Zunahme von Phosphatidfraktion auf Kosten von Fettsäuren (Seifen), die infolge von Verhalten und Zerfallen von Neutralfett in Organen bzw. Geweben gebildet werden, in Verbindung stehen; andererseits muß auch die Möglichkeit der Rekonstruktion der Phosphatidmoleküle im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Fettsäuren (*Wacker* und *Hueck*) vorausgesetzt werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die Einführung des Cholesterins in Olivenöl per os hat bei Hunden ähnliche quantitative Veränderungen des Blutcholesterins, wie die Einführung des Olivenöls allein zur Folge.

2. Die quantitativen Veränderungen von Gallencholesterin bei Belastung mit Cholesterin + Olivenöl sind dieselben, wie bei der Belastung mit Olivenöl allein.

3. Das exogen eingeführte, sowie auch das endogene Cholesterin bleibt hauptsächlich an den Lungen fixiert.

4. Die Sätze 1, 2, 3 berechtigen zu dem Schluß, daß es bei Hunden keine exogene alimentäre Cholesterinämie, sondern nur eine alimentäre lipogenetische endogene Cholesterinämie gibt.

5. Bei der Belastung mit Cholesterin + Olivenöl wird eine gewisse Phosphatid- bzw. Lipoidphosphorzunahme im peripheren Blute, ähnlich wie bei der Belastung mit Olivenöl allein, beobachtet.

6. Die Veränderungen von Fett und Lipoiden in den Venen der inneren Organe bei Belastung mit Cholesterin + Olivenöl sind dieselben,

wie bei Belastung mit Olivenöl allein, und zwar: Verminderung von Cholesterin, Phosphatiden und Fettsäuren mit paralleler Zunahme von Neutralfett in dem arteriellen Blute im Vergleich zum Blute des rechten Vorhofs; dagegen Abnahme von Neutralfett mit paralleler Cholesterin- und Phosphatidzunahme in dem Venenblute im Vergleich zu dem arteriellen.

7. Wie auch in der ersten Mitteilung, wird auf die Möglichkeit von Cholesterinbildung aus Neutralfett durch Fettsäuren und auf die Möglichkeit von Rekonstruktion bzw. Bildung von Phosphatidmolekülen bei dem Durchlauf des Blutes in den Geweben bzw. Organen hingewiesen.

Literatur.

Anitschkow, Deutsche med. Wochenschr. Nr. 16. 1913.; Zieglers Beitr. **70**. 1922; *Arndt*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **54**, 1927. — *Beumer*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **35**, 1923; Zeitschr. f. Kinderheilk. **33**, 1922; **37**, 1924; Deutsche med. Wochenschr. Nr. 6, 1925. — *Beumer* und *Lehmann*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **37**, 1923. — *Bang*. diese Zeitschr. **91**, **122**, 1918. — *Cabanès* und *Rouzard*, C. r. d. soc. biol. Nr. 14, 1913. — *Chalatow*, „Die anisotrope Verfettung". Jena 1922. — *Dezani* und *Cataretti*, *Sisto*, zit. nach *Beumer*. — *Gardner* und *Ellis*, *Gardner* und *Fox*, *Gamble* und *Blackfan*, zit. nach *Hueck* und Oppenheimers Handbuch der Biochemie, VIII, 1925. — *Grigaut*, Le cycle d. l. Cholest. Paris 1913. — *Hueck*, Verhandl. d. deutsch. Pathol. Ges. 1925. — *Kawamura*, „Morphologie und Physiologie der Choletserinsteatose. Jena 1927. — *Knack*, Virchows Arch. **220**, 1915. — *de Langen*, zit. nach *Hueck*. — *Levites*, Zeitschr. f. phys. Chem. **57**, 1908. — *Leupold*, zit. nach *Hueck*. — *Mjassnikow*, Zeitschr. f. klin. Med. **103**, 1926. — *Mjassnikow* und *Iljinsky*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **53**, 1926. — *Howard Mueller*, zit. nach Oppenheimers Handbuch und *Hueck*. — *Nedzwedski*, Pflügers Arch. **214**, 1926. — *Rosenthal* und *Patrzeck*, zit. nach *Hueck*. — *Rothschild*, Zieglers Beitr. **60**, 1915. — *Sano*, zit. nach *Hueck*. — *Schönheimer*, diese Zeitschr. **147**, 258, 1924. — *Ssokolow*, Virchows Arch. **245**, 1923; Zeitschr. ges. exper. Med. **46**, 1925. — *Stepp*, zit. nach *Hueck*. *Strauß*, Berl. klin. Wochenschr. S. 554, 1921. — *Strathmann-Herweg*, zit. nach *Hueck*. — *Thannhauser*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **141**, 1923. — *Thannhauser* und *Schaber*, Zeitschr. f. phys. Chem. **127**, 1923. — *Versé*, Verhandl. d. deutsch. Pathol. Ges. 1925. — *Wacker* und *Hueck*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **71**, **74**, **77**; diese Zeitschr. **100**, 84. 1919. — *Wacker* und *Beck*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **27**, 29, 1921; **33**, 1922. — *Weltmann* und *Biach*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. **14**, 1913,

Studien über Fett- und Lipoidstoffwechsel.

III. Mitteilung: Über alimentäre Lecithinämie.

Von

Samuel Leites (Charkow).

(Aus dem Laboratorium für pathologische Physiologie des Medizinischen Instituts zu Charkow, Ukraine.)

(Eingegangen am 17. Februar 1927.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Seit den Untersuchungen von *Bókay* und *Hasebroek*, welche von *Usuki*, *Wohlgemuth*, *Sieber* und *Schumowa-Simanovska*, *Clementi*, *Brugsch* und *Masuda*, *Morita* u. a. bestätigt worden sind, ist die Tatsache festgestellt, daß das Nahrungslecithin durch den Pankreassaft in Fett, Cholin und Glycerinphosphorsäure gespalten wird, obgleich dieselbe von *Stassano* und *Billon* verneint wird; jedoch ist die Untersuchungsmethodik der letzteren nicht sehr genau, um deren Angaben anzuerkennen (*Fr. N. Schulz*).

Einige Autoren (*Ssowzow*, *S. Fraenkel*) geben zu, daß ein Teil von Lecithinen auch ohne Spaltung in die Lymphe übergehen kann; es gibt jedoch keine direkte Beweise für unmittelbaren Übergang des alimentären Lecithins in die Lymphe bzw. seine Resynthese in der Darmwand (*Eckstein*).

Die Frage über das weitere Schicksal der Spaltungsprodukte des Lecithins, sowie über die Lokalisation seiner Resynthese ist noch ganz unaufgeklärt. Die Versuche von *Franchini* sowie von *Morita*, welche gezeigt haben, daß bei den mit Lecithin gefütterten Kaninchen der Phosphorgehalt in der Leber zunimmt, sprechen für eine gewisse Bedeutung der letzteren in den Prozessen des Lecithinmetabolismus. *Eichholtz* hält auch die geringe Phosphorzunahme im Blute der mit Lecithin gefütterten Hündchen für eine Folge von Fixation, Zurückhalten desselben in der Leber. Nach *Bloor* und *Eckstein* ist die Phosphatidresynthese nur nach deren Übergang ins Blut möglich. *Babarczy* bekam bei lecithinreicher Nahrung (Gehirn) beim Menschen keinen eindeutigen Einfluß auf den Lecithin-Cholesterinquotient. Diese Untersuchungen lassen jedoch die Frage über die Beziehungen zwischen Phosphatiden des Organismus und Nahrungsphosphatiden offen: Erscheint die Einführung von Nahrungslecithin als eine nötige Bedingung für deren Bildung, oder genügt nur das Vorhandensein der in die Zusammensetzung der Lecithinmoleküle eingehenden Komponenten, unabhängig von deren Eintretungsart mit der Nahrung? Es bleibt, mit anderen Worten, die Frage nach der Spezifität der alimentären Lecithinämie hinsichtlich des Nahrungslecithins, und das

damit verbundene Problem über die exo- oder endogene Entstehung von Organismusphosphatiden bzw. -lecithinen ungelöst.

Die Tatsache, daß die Einführung von Neutralfett bzw. Neutralfett + Cholesterin, laut den Untersuchungen von *Bloor, Reicher, Wacker* und *Hueck, Iwatsuru* und *unsere*[1]), die Phosphatidämie zur Folge hat, zeigt, daß die letztere nicht nur durch die Nahrungsphosphatide allein bedingt wird. Auf Grund der Ergebnisse über die Phosphatidverteilung im arteriellen und venösen Blute haben wir[1]) diese lipogenetische Phosphatidämie in Verbindung mit der Fixation von Neutralfett in den Geweben bzw. Organen gebracht, und zwar in dem Sinne, daß die frei werdenden Fettsäuren bei der möglichen Neutralfettzerlegung in den Geweben zur Bildung der Phosphatidmoleküle ausgenutzt werden.

Es war somit notwendig, die Frage aufzuklären, ob die durch Nahrungsphosphatide hervorgerufene alimentäre Phosphatidämie als sui generis, spezifische, von der lipogenetischen Phosphatidämie verschieden erscheint, oder der Ursprung derselben derjenige wie der lipogenetischen ist. In dieser Richtung haben wir Versuche mit Lecithinbelastung der Tiere (Hunde) unternommen.

Methodik: Den Tieren wurde nüchtern (nach 18stündigem Hungern) Lecithin der Firma Gehe u. S. per os eingeführt. Das periphere Blut wurde 3, 5, 7 und 24 Stunden nachher auf Neutralfett, freies und gebundenes Cholesterin, Phosphatide und Lipoidphosphor untersucht.

Die Bestimmungen wurden nach *Bangs* Mikromethode, der lipoide Phosphor nach *Briggs* vorgenommen[1]).

Im ganzen wurden sechs Versuche mit Lecithinbelastung an fünf Hunden ausgeführt. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle I angegeben.

Tabelle I.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol + Petroläther-frakt. Proz.
4. I. 1926. Hund Nr. 2. Gewicht 8,5 kg.									
Präform. . .	0,128	0,088	0,040	0,462	0,130*)	0,315*)		0,170*)	0,590
Um 10h20' morgens 20 g Lecithin *Gehe u. S.* per os eingeführt.									
Nach 3 Stdn.	0,141	0,101	0,040	0,482	0,147	0,327		0,187	0,623
„ 5 „	0,142	0,100	0,042	0,482	0,147	0,327		0,189	0,624
„ 7 „	0,140	0,098	0,042	0,588	0,203	0,339		0,245	0,828
„ 24 „	0,130	0,089	0,041	0,462	0,133	0,336		0,174	0,582
9. I. 1926. Hund Nr. 4. Gewicht 9 kg.									
Präform. . .	0,139	0,078	0,061	0,222	0,046	0,210	7,44	0,107	0,361
Um 9h40' morgens 20 g Lecithin *Gehe u. S.* per os eingeführt.									
Nach 3 Stdn.	0,144	0,052	0,092	0,230	0,050	0,210	7,52	0,142	0,374
„ 5 „	0,123	0,058	0,065	0,323	0,091	0,240	7,96	0,156	0,426
„ 7 „	0,128	0,060	0,068	0,297	0,062	0,207	8,00	0,130	0,375

[1]) *S. Leites*, Studien über Fett- und Lipoidstoffwechsel, I. und II. Mitteilung, diese Zeitschrift **184**, 273 und 300, 1927.

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-cholesterin Proz.	Alkohol- + Petroläther-frakt. Proz.
28. XII. 1925. Hund Nr. 5. Gewicht 7200 g.									
Präform. . .	0,106	0,052	0,054	0,254	0,067	0,204	8,0	0,121	0,360
Um 9h50′ morgens 20 g Lecithin *Gehe u. S.* per os eingeführt.									
Nach 3 Stdn.	0,167	0,073	0,094	0,317	0,072	0,285	8,66	0,166	0,484
„ 5 „	0,116	0,063	0,053	0,272	0,062	0,243	8,6	0,125	0,388
„ 7 „	0,097	0,045	0,052	0,321	0,094	0,231	8,0	0,146	0,418
„ 24 „	0,106	0,050	0,056	0,254	0,067	0,204	8,18	0,123	0,360
25. II. 1926. Hund Nr. 7. Gewicht 9 kg.									
Präform. . .	0,117	0,071	0,046	0,273	0,058	0,255	7,0	0,104	0,390
Um 9h50′ morgens 20 g Lecithin *Gehe u. S.* per os eingeführt.									
Nach 3 Stdn.	0,145	0,098	0,047	0,376	0,077	0,360	7,73	0,124	0,521
„ 5 „	0,188	0,123	0,065	0,306	0,071	0,270	7,93	0,136	0,494
„ 7 „	0,196	0,083	0,113	0,485	0,117	0,417	9,35	0,230	0,681

*) Die verhältnismäßig hohen Zahlen von gebundenem Cholesterin und Phosphatiden im Blute bei Hunde Nr. 2 sind durch die chronische Einführung von Olivenöl (vgl. erste Mitteilung) bedingt.

Die Ergebnisse der Tabelle I (zwei unerwähnte Versuche gaben ähnliche Ergebnisse) zeigen, daß die Einführung per os von Lecithin eine sehr geringe Zunahme von lipoidem P hervorruft; nur in zwei Versuchen (Hund 7 und ein in der Tabelle unerwähnter Versuch) stieg der Gehalt von Lipoidphosphor um 30 Proz. 7 Stunden nach der Lecithineinführung. Die Zunahme der Phosphatidfraktion bei Belastung mit Lecithin ist stärker (Hunde 5 und 7); jedoch insofern als dieselbe weder parallel noch proportional der Zunahme des Lipoidphosphors verläuft, muß die letztere als von der Mengenzunahme der in diese Fraktion eingehenden Fettsäuren (Seifen) verursacht betrachtet werden.

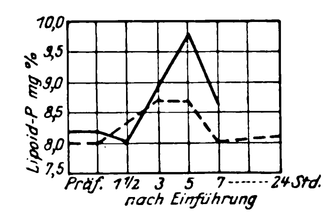


Abb. 1.

Lipoidphosphorblutspiegel beim Hunde Nr. 5 nach Einführung per os 50,0 ol. olivarum (———) und 20 g Lecithin (– – –).

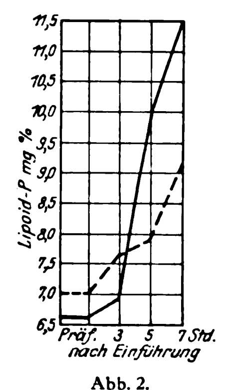


Abb. 2.

Lipoidphosphorblutspiegel beim Hunde Nr. 7 nach Einführung per os 50,0 acidi oleinici (———) und 20 g Lecithin (– – –).

Wenn wir die Veränderung des Lipoidphosphors bzw. der Phosphatidfraktion bei Belastung mit Olivenöl bzw. Oleinsäure mit denselben des Lipoidphosphors bei Belastung mit Lecithin (Kurven Abb. 1 und 2) zusammenstellen, ist *der Zunahmegrad von Lipoidphosphor bei Lecithineinführung geringer als bei Belastung mit Olivenöl und besonders Oleinsäure.*

Die Versuche mit Lecithinbelastung zeigen also die Unmöglichkeit, eine spezifische exogene Nahrungslecithinämie bzw. Phosphatidämie hervorzurufen.

Auffallend ist die bei der Lecithinbelastung auftretende Blutcholesterinzunahme, die (bei verschiedenen Hunden) auf 30—100 Proz. steigt, was auch von anderen Autoren (*Reicher*, *Röhl*, *Stepp*, *Mc Collum* und *Halpin*, *Iwatsuru*) betont wird. Diese Zunahme von Cholesterin geschieht auf Kosten wie des freien, als auch gebundenen.

Was nun das Neutralfett anbetrifft, so wurde nur in einem Versuch dessen geringe Abnahme (Hund 4) festgestellt, dagegen in den übrigen

Tabelle II.

Hund 22, Gewicht 11,2 kg.

4. Juni 1926: 7 Uhr vormittags per os 20,0 g Lecithin *Gehe u. S.* eingeführt.
1 „ 30 Minuten vormittags subkutan 10 ccm 2 proz. Morph. injiziert.
1 „ 50 Minuten nachmittags Äthernarkose.
2 „ nachmittags Laparotomie; das Blut entnommen aus:

	Petroläther-fraktion Proz.	Neutralfett Proz.	Freies Cholesterin Proz.	Alkohol-fraktion Proz.	Gebundenes Cholesterin Proz.	„Phosphatide" Proz.	Lipoider P mg-Proz.	Gesamt-Cholesterin Proz.	Alkohol + Petroläther-fraktion Proz.
1. A. lienalis	0,146 (0,53)	0,100 (0,36)	0,046 (0,17)	0,411 (1,5)	0,053 (0,18)	0,477 (1,77)	7,4 (27,9)	0,099 (0,35)	0,557 (2,03)
2. V. lienalis	0,194 (0,68)	0,115 (0,36)	0,077 (0,22)	0,373 (1,31)	0 0	0,561 (1,95)	9,3 (37,0)	0,077 (0,22)	0,567 (1,99)
3. V. hepatica	0,181 (0,65)	0,065 (0,25)	0,116 (0,30)	0,427 (1,46)	0,024 (0,08)	0,576 (1,98)	11,6 (41,5)	0,140 (0,48)	0,608 (2,09)
4. V. porta	0,171 (0,67)	0,120 (0,38)	0,051 (0,29)	0,450 (1,50)	0,021 (0,08)	0,609 (2,13)	8,3 (31,6)	0,072 (0,37)	0,621 (2,17)
5. V. femoralis	0,163 (0,59)	0,070 (0,25)	0,094 (0,34)	0,339 (1,22)	0,015 (0,05)	0,471 (1,71)	8,3 (30,5)	0,109 (0,39)	0,503 (1,81)
6. V. suprarenal.	—	—	—	—	—	—	9,5 (37,6)	—	—
7. Peripher. Blut (Ohr)	0,166 (0,59)	0,079 (0,28)	0,087 (0,31)	0,327 (1,20)	0,048 (0,17)	0,363 (1,35)	10,0 (38,8)	0,135 (0,48)	0,493 (1,79)
8. Rechter Vorhof	0,167 (0,59)	0,065 (0,25)	0,102 (0,34)	0,482 (1,62)	0,028 (0,1)	0,648 (2,16)	8,3 (33,6)	0,130 (0,45)	0,649 (2,21)

Die Chylusgefäße gefüllt, milchweiß.

Die Ziffern in Klammern bedeuten die Menge von Fett bzw. Lipoiden auf festen Rückstand nach *Bang* berechnet.

eine Zunahme von 13 bis 74 Proz. Es ist dabei zu bemerken, daß *Hesse* eine ziemlich starke Fettablagerung bei mit Lecithin chronisch gefütterten Ratten gefunden hat.

Die Tatsache, daß die Fettsäuren als eines der Produkte von Lecithinspaltung in dem Darme auftreten, kann die Zunahme von Blutcholesterin bei Belastung mit Lecithin als Folge von Resorption der Fettsäuren betrachtet werden; dies insofern, als wir gezeigt haben[1]), daß die Belastung mit Fettsäuren zur Cholesterinämie führt; die Zunahme von Neutralfett findet auch seine Erklärung darin.

Um das Schicksal des in den Darm eintretenden Lecithins aufzuklären, haben wir Versuche mit Fett- und Lipoiduntersuchungen in den Arterien und Venen der inneren Organe ausgeführt; die Methodik und Versuchsanordnung war dieselbe wie in den Versuchen mit Lipoiden- und Fettverteilung bei der Belastung mit Olivenöl bzw. Oleinsäure (s. I. Mitteilung). Im ganzen wurden zwei Versuche ausgeführt, mit ähnlichen Ergebnissen; der eine von denselben ist in der Tabelle II angeführt.

Die Ergebnisse des Versuchs, die in Tabelle II angeführt sind, zeigen, daß kein verhältnismäßiges Überwiegen von Lipoidphosphor in V. porta und rechtem Vorhof zu bemerken ist; es kann in denselben nur eine Zunahme von Fettsäuren (Seifen) festgestellt werden, deren Anwesenheit durch Phosphatidfraktionssteigerung ausgedrückt ist; die letztere enthält, nach *Bang*, außer Phosphatiden auch Seifen; insofern, als der Gehalt von Lipoidphosphor in V. porta und rechtem Vorhof der Phosphatidfraktionssteigerung nicht proportional ist, muß die letztere auf Rechnung der Fettsäuren (Seifen) gesetzt werden. Wir können also die Tatsache feststellen, daß nicht Lecithin als solches aus dem Darm ins Blut bzw. die Lymphe tritt, sondern dessen Spaltungsprodukte, speziell die Fettsäuren.

Ähnlich wie in den Versuchen bei Belastung mit Olivenöl, Olivenöl + Cholesterin und Oleinsäure[2]) ist der Gehalt an Lipoidphosphor bzw. Phosphatiden in dem Venenblut größer als in dem arteriellen, wobei diese Steigerung am stärksten in den V. hepatica, lienalis und suprarenalis ausgeprägt ist.

Indem die Zunahme von Lipoidphosphor in den V. hepatica und suprarenalis eine beständige Erscheinung darstellt, finden wir in den V. lienalis und femoralis wie eine Lipoidphosphorsteigerung in den einen Versuchen (s. Tabellen III und IV der II. Mitteilung), als auch eine Abnahme in den anderen (s. Tabellen IX und X der I. Mitteilung). Diese Tatsache zeigt, daß in der Milz einerseits, in dem Knochenmark und Unterhautgeweben andererseits Prozesse von Phosphatidbildung, sowie deren Fixation und Zerfall stattfinden können, so daß der Gehalt an Lipoidphosphor in den V. lienalis und femoralis in jedem gegebenen Moment eine algebraische Summe von zwei entgegengesetzten Prozessen darstellt. Außer der Milz und Unterhautgewebe (sowie dem Knochenmark, V. femoralis) findet Fixation und Zerfall von Phosphatiden und Lecithin auch in den Lungen statt, was die Versuche mit Einführung von kolloidaler Lecithinlösung[3]) in die V. jugularis (Tabelle III) beweisen.

---

[1]) S. I. Mitteilung.

[2]) S. I. und II. Mitteilung.

[3]) Nach *Keeser*, diese Zeitschr. **154**, 321, 1924, hergestellt.

Tabelle III.

Hund 3 (29), Gewicht 10 kg.

17. September 1926. Die A. femoralis — ohne Narkose — abseparient. In die V. jugularis sind 10 ccm von 3,2proz. kolloidaler Lecithinlösung (*Gehe u. S.*) (0,32 Lecithin, 12,8 mg lipoider P) eingeführt worden.

Gehalt in A. femoralis	Vor der Injektion	Im Moment der Injektion	Nach 5 Min.	Nach 20 Min.
Lipoidphosphor . . mg-Proz.	9,0	8,7	9,0	9,1
Neutralfett. . . . . . . Proz.	0,028	0,055	0,060	0,028
Freies Cholesterin . . . „	0,053	0,060	0,052	0,090
Gebundenes Cholesterin . „	0,013	0,078	0,060	0,048

Hund 15 (41), Gewicht 11,2 kg.

27. Dezember 1926. A. femoralis — ohne Narkose — abseparient; 10 ccm von 3,2proz. kolloidaler Lecithinlösung — *Gehe u. S.* — (0,32 Lecithin, 12,8 mg P) in die V. jugularis eingeführt.

Gehalt in A. femoralis	Vor der Injektion	Im Moment der Injektion	Nach 5 Min.	Nach 20 Min.
Lipoidphosphor . . mg-Proz.	10.0	9.48	10.0	9.97
Neutralfett . . . . . . Proz.	0,032	0,031	0,053	0,076
Freies Cholesterin . . . „	0,046	0,046	—	0,042
Gebundenes Cholesterin . „	0,073	0,095	—	0,073

Neutralfett und Cholesterin nach *Bang*, Lipoidphosphor nach *Briggs* bestimmt.

Die Tabelle III zeigt, daß die Lecithineinführung in die V. jugularis keine Steigerung von lipoidem Phosphor in dem arteriellen Blute hervorruft; derselbe bleibt also in den Lungen zurückgehalten.

Die Zunahme von Neutralfett und Cholesterin (hauptsächlich von Estern) in dem Arterienblut spricht dafür, daß nicht nur Zurückhaltung von Lecithin in den Lungen stattfindet, sondern auch dessen Zerfall mit Bildung von Neutralfett und Cholesterin aus den Zerfallsprodukten (Fettsäuren). Diese Tatsache bestätigt noch einmal die von uns in der I. und II. Mitteilung vorausgesetzte liposynthetische Funktion der Lungen und die Möglichkeit der Cholesterinbildung aus Fettsäuren. Das Vorhandensein von Glycerophosphatase in den Lungen ist auch ein Hinweis auf die Möglichkeit der Lecithinspaltung in den Lungen (*Grosser* und *Hussler*, *Mueller*, *Forrai*).

Was die Verteilung von Neutralfett und Cholesterin in dem Blute von Arterien und Venen bei der Belastung mit Lecithin anbetrifft, so ist dieselbe ähnlich wie bei Einführung von Olivenöl bzw. Oleinsäure, und zwar in den Arterien Steigerung von Neutralfett mit paralleler Abnahme von Cholesterin, in Venen dagegen Abnahme des Neutralfettes mit paralleler Cholesterinsteigerung, wobei die letztere in der V. hepatica am stärksten ausgedrückt ist.

Bei der Zusammenstellung unserer Ergebnisse kommen wir zu dem Schlusse, daß es keine spezifische exogene Lecithinämie gibt; die Körperlecithine sind von endogenem Ursprung und deren Bildung steht mit dem Neutralfettmetabolismus in enger Verbindung, indem die Spaltungsprodukte der letzteren — Fettsäuren — an der Bildung der Lecithinmoleküle teilnehmen.

In dieser Hinsicht kann man *Bloors* Meinung beistimmen, der das Fett als eine inaktive Form von Lipoiden, und das Lecithin als erste Etappe für Fettutilisation betrachtet; damit stimmen auch die Ergebnisse von *Reicher, Leathes, Hueck* und *Wacker*, laut welchen der oxydative Abbau von Fett durch Lecithin stattfinden kann. Der Zyklus der Metabolie des Lecithins im Organismus wiederholt fast vollkommen denselben von Cholesterin, den wir in der II. Mitteilung betrachtet haben: Lecithin wie auch Cholesterin werden endogen in den Geweben und Organen gebildet, wobei die Teilnahme der Leber am meisten ausgeprägt ist; diese Bildung von Cholesterin und Lecithin ist an den Metabolismus des Neutralfettes gebunden. Das Zurückhalten, sowie anscheinend auch der Zerfall von Lecithin und Cholesterin findet hauptsächlich in den Lungen statt; andere Organe, in welchen Zurückhaltung von Lecithin und Cholesterin stattfinden kann, sind die Milz und wahrscheinlich auch das Knochenmark und das subkutane Bindegewebe, die letzteren hauptsächlich hinsichtlich des Lecithins. Der Zyklus der Metabolie von Neutralfett, Cholesterin und Lecithin im Körper stellt einen geschlossenen Kreis dar: *die Lipodiurese und die Lipoidosynthese in den Geweben und Organen* (hauptsächlich in der Leber) *einerseits, und die Lipoidodiurese mit paralleler Liposynthese in den Lungen* (teils auch in der Milz) *andererseits.*

Schlußfolgerungen.

1. Die Einführung per os von Lecithin ruft bei den Hunden nach 5—7—24 Stunden eine geringe Zunahme von lipoidem Phosphor bzw. Phosphatiden im Blute hervor, welche die Steigerung von Lipoidphosphor bei Einführung von Olivenöl bzw. Olivenöl + Cholesterin bzw. Oleinsäure nicht übertrifft.

2. Bei Einführung des Lecithins per os wird kein Überwiegen von Lipoidphosphor weder in V. porta noch im rechten Vorhof im Vergleich zu den anderen Venen beobachtet.

3. Bei Einführung des Lecithins per os erscheint die Verteilung von Fett und Lipoiden in dem Arterien- und Venenblute dieselbe, wie bei der Belastung mit Olivenöl bzw. Olivenöl + Cholesterin bzw. Oleinsäure. Die Steigerung von Lipoidphosphor ist am deutlichsten in den V. hepatica, lienalis und suprarenalis ausgeprägt. Die Einführung von Lecithin in V. jugularis ruft nicht dessen Zunahme in dem Arterienblute hervor.

4. Die Schlüsse von 1., 2. und 3. führen zu der Annahme von Abwesenheit einer spezifischen exogenen alimentären Phosphatidämie; es gibt nur eine endogene alimentäre lipogenetische Phosphatidämie.

5. Die Einführung von Lecithin sowohl per os, als auch intravenös hat eine Zunahme von Neutralfett und Cholesterin im Blute zur Folge.

6. Die Versuche mit Einführung des Lecithins per os, sowie intravenös, bestätigen die in den Mitteilungen I und II angeführten Annahmen über die liposynthetische Rolle der Lungen sowie über Cholesterinbildung aus Neutralfett durch Fettsäuren.

Literatur.

Bloor, Journ of biol. Chem. **25**, Nr. 3, 1916. — *Bokay*, Zeitschr. f. phys. Chem. **1**, 1877. — *Babarczy*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **147**, 1925. — *Brugsch* und *Masuda*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. **8**, 1911. — *Eichholz*, diese Zeitschr. **144**, 149, 1924. — *Eckstein*, Journ. of biol. Chem. **62**, 1925. — *Fraenkel*, „Dynamische Biochemie". Wiesbaden 1911. — *Franchini*, diese Zeitschr. **6**, 210, 1907. — *Forrai*, ebendaselbst **142**, 282, 1923. — *Grosser* und *Hussler*, ebendaselbst **39**, 1, 1912. — *Hasebroeck*, Zeitschr. f. phys. Chem. **12**, 1888. — *Hesse*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **105**, 1925. — *Hueck* u. *Wacker*, diese Zeitschr. **100**, 84, 1919. — *Iwatsuru*, Pflügers Arch. **214**, 1926. — *Leathes*, The Fats, London 1913. — *Morita*, Journ. of Biochem. **4**, Nr. 1, 1924. — *Mc Collum* und *Halpin*, Journ. of biol. Chem. **11**, **13**, 1912. — *Reicher*, Verhhandl. d. Kongr. f. inn. Med. **28**, 1911. — *Röhl*, ebendaselbst **29**, 1912. — *Stepp*, diese Zeitschr. **22**, 452, 1909. — *Sslowzow*, Hofmeisters Beitr. **7**, 1905. — *Sieber* und *Schumowa-Simanowska*, Zeitschr. f. phys. Chem. **49**, 1906. — *Fr. N. Schulz*, Oppenheimers Handb. d. Biochem. VIII, 2. Aufl. — *Usuki*, *Wohlgemuth*, *Mueller*, *Stassano* und *Billon*, zit. nach *Fr. N. Schulz*.

Beiträge zur Frage der Glykolyse [1]).

VII. Mitteilung:

Über die Beziehung der Verteilung des Phosphors im Blute zur Glykolyse.

Von

P. Rona und **Ken Iwasaki.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität, Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 1. März 1927.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

1. In der vorherigen Mitteilung [2]) wurde gezeigt, daß die Gesamtmenge des Phosphors, die sich außer dem direkt fällbaren anorganischen Phosphat in der enteiweißten Blutflüssigkeit befindet, dort in Form esterartiger, säurehydrolysierbarer Verbindungen vorhanden ist. Die nächste Aufgabe war, zu prüfen, wie dieser Ester (oder diese Ester) auf Blutkörperchen und Serum verteilt ist [3]).

Zur Klärung dieser Frage sind die Versuche 1 bis 5 bei p_H 6 und 7 angestellt worden, die in den Tabellen I bis V niedergelegt sind.

Tabelle I.

p_H 7,4. 37°. Hämatokritwert: nach der Blutentnahme 67 Proz. S(erum), 33 Proz. F(ormelemente); nach 10 Stunden 64 Proz. S, 36 Proz. F.

		Serum g			Formelemente g			Serum + Formelemente	Im defibriniertem Blut (direkt) Proz.
		in 67 g	in 64 g	in 100 g	in 33 g	in 36 g	in 100 g		
Anorg. P (als P_2O_5)	sofort	0,0064	—	0,0095	0,0142	—	0,043	0,0206	0,0198
	nach 10 Std.	—	0,0193	0,0302	—	0,0140	0,0389	0,0333	0,0343
Gesamt-P (als P_2O_5)	sofort	0,0069	—	0,0103	0,0645	—	0,195	0,0714	0,0722
	nach 10 Std.	—	0,0197	0,0308	—	0,0548	0,152	0,0745	0,0768
Ester-P (als P_2O_5)	sofort	0,0005	—	0,00078	0,0503	—	0,152	0,0508	0,0524
	nach 10 Std.	—	0,0004	0,00063	—	0,0408	0,114	0,0412	0,0425

P-Bestimmung nach *Embden*.

[1]) Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft.

[2]) Diese Zeitschr. **174**, 293, 1926.

[3]) Vgl. hierzu *P. Iversen*, diese Zeitschr. **109**, 211, 1920. Vgl. ferner *H. Lawaczeck*, „Über die Dynamik der Phosphorsäure des Blutes", diese Zeitschr. **145**, 351, 1924.

Tabelle II.

p_H 7,58. 37°. a) Bestimmung nach *Embden*, b) Bestimmung nach *Lieb*. Hämatokritwert: sofort nach der Blutentnahme 66 Proz. S(erum), 34 Proz. F(ormelemente); nach 6 Stunden 65 Proz. S, 35 Proz. F.

		Im Serum g		In den Formelementen g		Im defibrinierten Blut (direkt)
		in 66 g	in 65 g	in 34 g	in 35 g	Proz.
A Anorg. P (als P_2O_5)	sofort	a) 0,00635 b) 0,00627	— —	a) 0,0154 b) 0,0177	— —	a) 0,0197 b) 0,0270
	nach 6 Std.	— —	a) 0,0132 b) 0,0132	— —	a) 0,0247 b) 0,0254	a) 0,0351 b) 0,0353
B Anorg. P + Phosphorsäureester (Autoklavenwert als P_2O_5)	sofort	b) 0,0072	—	b) 0,0757	—	b) 0,0818
	nach 6 Std.	—	b) 0,0143	—	b) 0,0691	b) 0,0832
Phosphorsäureester B—A (als P_2O_5)	sofort	a) 0,00085 b) 0,00093	— —	a) 0,0603 b) 0,0580	— —	a) 0,0621 b) 0,0548
	nach 6 Std.	— —	a) 0,0011 b) 0,0011	— —	a) 0,0444 b) 0,0437	a) 0,0481 b) 0,0479
Gesamt-P (nach Veraschung) als P_2O_5	sofort	b) 0,00743	—	b) 0,0768	—	b) 0,0829
	nach 6 Std.	—	b) 0,01470	—	b) 0,0707	b) 0,0846

Tabelle III.

p_H 7,58. 37°. a) Bestimmung nach *Embden*, b) Bestimmung nach *Lieb*. Hämatokritwert: sofort nach der Blutentnahme 66 Proz. S(erum), 34 Proz. F(ormelemente); nach 11 Stunden 60 Proz. S, 40 Proz. F.

		Im Serum g		In den Formelementen g		Im defibrinierten Blut (direkt)
		in 66 g	in 60 g	in 34 g	in 40 g	Proz.
A Anorg. P (als P_2O_5)	sofort	a) 0,00635 b) 0,00627	— —	a) 0,0154 b) 0,0177	— —	a) 0,0197 b) 0,0270
	nach 11 Std.	— —	a) 0,0239 b) 0,0237	— —	a) 0,0218 b) 0,0286	a) 0,0433 —
B Anorg. P + Phosphorsäureester (Autoklavenwert als P_2O_5)	sofort	b) 0,0072	—	b) 0,0757	—	b) 0,0818
	nach 11 Std.	—	b) 0,0245	—	b) 0,0572	b) 0,0846
Phosphorsäureester B—A (als P_2O_5)	sofort	a) 0,00085 b) 0,00093	— —	a) 0,0603 b) 0,0580	— —	a) 0,0548 b) 0,0621
	nach 11 Std.	— —	a) 0,0006 b) 0,0008	— —	a) 0,0354 b) 0,0286	a) 0,0413 b) 0,0246
Gesamt-P (nach Veraschung) als P_2O_5	sofort	b) 0,00743	—	—	b) 0,0768	b) 0,0829
	nach 11 Std.	—	b) 0,0248	—	b) 0,0582	b) 0,0865

Tabelle IV.

p_H 6,04. 37°. Bestimmung nach *Lieb*. Hämatokritwert: sofort nach der Blutentnahme 68 Proz. S(erum), 32 Proz. F(ormelemente); nach 6 Stunden 62 Proz. S, 38 Proz. F.

		In Serum g		Im defibrinierten Blut (in 100 g)	In den Formelementen g	
		in 68 g	in 62 g		in 32 g	in 38 g
A Anorg. P (als P_2O_5)	sofort	0,0055	—	0,0198	0,0143	—
	nach 6 Std.	—	0,0188	0,0382	—	0,0194
B Gesamt-P (als P_2O_5) (Autoklavenwert)	sofort	0,00625	—	0,0790	0,0728	—
	nach 6 Std.	—	0,0231	0,0807	—	0,0576
Phosphorsäureester B — A (als P_2O_5)	sofort	0,00074	—	0,0592	0,0585	—
	nach 6 Std.	—	0,0043	0,0425	—	0,0382

Tabelle V.

p_H 6,04. Bestimmung nach *Lieb*. Hämatokritwert: sofort nach der Blutentnahme 68 Proz. S(erum), 32 Proz. F(ormelemente); nach 10 Stunden 60 Proz. S, 40 Proz. F.

		In Serum g		Im defibrinierten Blut (in 100 g)	In den Formelementen g	
		in 68 g	in 60 g		in 32 g	in 40 g
A Anorg. P (als P_2O_5)	sofort	0,0055	—	0,0198	0,0143	—
	nach 10 Std.	—	0,0226	0,0422	—	0,0196
B Gesamt-P (als P_2O_5) (Autoklavenwert)	sofort	0,00625	—	0,0790	0,0728	—
	nach 10 Std.	—	0,0279	0,0808	—	0,0529
Phosphorsäureester B — A (als P_2O_5)	sofort	0,00074	—	0,0592	0,0585	—
	nach 10 Std.	—	0,0054	0,0366	—	0,0313

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß der Phosphorsäureester, den wir der Kürze halber Px nennen wollen (beim Kaninchen), so gut wie ausschließlich in den Formelementen vorhanden ist; in dem Serum findet man (so gut wie) nichts davon. Die Menge des anorganischen Phosphors nimmt bei Behandlung des enteiweißten Serums mit 2 Proz. HCl unter Druck kaum zu, während sie sich in den Formelementen bei derselben Behandlung außerordentlich stark vermehrt. Es ist hierfür gleichgültig, ob man bei p_H 6 oder bei p_H 7 arbeitet. Hiermit stimmt es auch überein, daß es gleichgültig ist, ob man das anorganische Phosphat im Serum

(nicht in den Blutkörperchen) nach *Lieb* oder nach *Embden* bestimmt. Dieser Px tritt aus den Blutkörperchen selbst während sechs- bis elfstündigen Stehens (bei 37°) nicht in das Serum; nur wenn Hämolyse eintritt, was bei p_H 6 in geringem Grade vorkommt, kann ein spurweiser Übertritt beobachtet werden. Ob außer den roten Blutkörperchen auch die weißen für den Ester in Betracht kommen, müssen weitere Untersuchungen lehren.

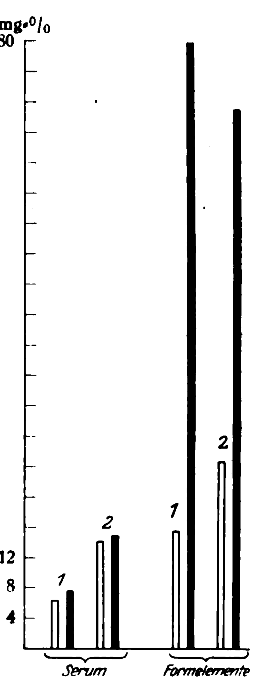


Abb. 1. (Tab. II.)
1 = sofort; 2 = nach 6 Stunden; □ anorg. P direkt fällbar; ■ anorg. P n. Autoklavisierung.

Um zu prüfen, wie es mit der Dialysierbarkeit dieser esterartigen Phosphorverbindung steht, wurde enteiweißtes Kaninchenblut (15 ccm) in Schleicher-Schüllhülsen gegen 3proz. NaCl-Lösung (15 ccm) 60 Stunden lang dialysiert.

100 g defibrinierten Kaninchenbluts wurden abzentrifugiert, die Formelemente mit 100 ccm destillierten Wassers, 100 ccm 2proz. Salzsäure und 100 ccm 5proz. Sublimats behandelt, nach 20 Stunden abgenutscht, das Filtrat nach Einleiten von H_2S neutralisiert, auf etwa 30 ccm eingeengt, schließlich auf 50 ccm aufgefüllt. 50 ccm enteiweißter Blutflüssigkeit entsprechen 100 g Blut.

Der Verlauf der Dialyse ist aus Tabelle VI ersichtlich.

Tabelle VI.

	Dauer der Dialyse	Anorg. P als P_2O_5. Proz. nach *Embden*		$\frac{B}{A}$ *)	Gesamt-P als P_2O_5. Proz. nach *Lieb*		$C + D$ **)	*Px*		$\frac{F}{E}$
		A innen	*B* außen		*C* innen	*D* außen		*E* innen	*F* außen	
I	20h	0,0700	0,0667	0,953	0,500	0,351	0,851	0,430	0,284	0,645
II	60	0,0678	0,0658	0,971	0,432	0,411	0,843	0,364	0,345	0,95

*) $A + B$ 0,1367 bzw. 0,1336 Proz. P_2O_5; direkt gefunden 0,140 Proz. P_2O_5. — **) Direkt gefunden 0,874.

Es zeigt sich, daß die esterartige Verbindung Px wohl dialysabel, aber außerordentlich langsam dialysabel ist. Während die Dialyse des anorganischen Phosphats nach 20 Stunden beendet ist, sind bei Px nur 65 Proz. dialysiert; erst nach 60 Stunden ist die Konzentration innen und außen gleich. Noch langsamer verlief die Dialyse bei Anwendung der hämolysierten roten Blutkörperchen von Kaninchen.

Da waren nach 2 Tagen nur etwa 15 Proz. von Px in die Außenlösung getreten. Dies spricht gegen die Auffassung, daß wir es hier mit einer niedrig molekularen Verbindung zu tun haben.

2. Die folgenden Versuche prüften das Verhalten der Spaltung des Px in ihrer Abhängigkeit von der Menge des im System vorhandenen Traubenzuckers. Es zeigte sich, daß die Bildung des direkt fällbaren anorganischen Phosphors durch die fermentative Spaltung sehr deutlich von der gegenwärtigen Zuckermenge abhängt: wird diese vermehrt, so wird die Spaltung gehemmt, d. h. das Gleichgewicht Phosphorsäureester $\rightleftharpoons$ Phosphorsäure + Alkohol (Kohlehydrat) nach der Richtung der Synthese verschoben. Bei diesen Versuchen wurden die Blutkörperchen vom Serum sorgfältig befreit, mit Ringerlösung in dem in den Versuchen angegebenen Verhältnis vermischt, und in Reihenversuchen die Zunahme des direkt fällbaren anorganischen Phosphors nach mehrstündiger Autolyse bei 37° ohne und mit Zuckerzusatz bei den angegebenen H-Konzentrationen festgestellt. Wenn nicht anders angegeben, wurde der Phosphor immer nach *Embden* bestimmt.

Tabelle VII.

Kaninchenblut. 37°.

		Traubenzuckergehalt der Formelemente + Ringerlösung in Proz.		p_H		P_2O_5 g in 100 g Suspension	
		sofort	nach 7 Std.			Anorg. P	Gesamt-P
1	ohne Traubenzuckerzusatz	0,034	0,0325	7,49	sofort	0,0149	0,0678
2		0,034	0,0325	—	nach 7 Std.	0,0473	0,0678
3		0,0325	0,031	7,40		0,0474	0,0674
4	mit Traubenzuckerzusatz	0,091	0,031	—		0,0371	0,0674
5		0,238	0,130	7,38		0,0336	0,0674
6		0,795	0,690	—		0,0332	0,0665

Der erste orientierende Versuch (vgl. Tabelle VII) zeigt, daß die Blutkörperchensuspension eine Restreduktion (bestimmt nach *Hagedorn-Jensen*) von 0,034 Proz. (auf Traubenzucker berechnet) aufweist, die auch nach 7 Stunden (bei 37° und p_H 7,4) von der Glykolyse unberührt bleibt. Der anorganische Phosphor stieg von 0,0149 g in 100-g-Suspension in 7 Stunden auf 0,0473 g, also um 217 Proz. Fügte man Traubenzucker zu 0,091 bzw. zu 0,238 und 0,795 Proz. zu, so betrug die Zunahme des anorganischen P unter denselben Bedingungen nur 150 bzw. 125 Proz. In Versuch (Tabelle VIII) stieg der anorganische P von 0,050 g P_2O_5 in 100 g Formelementen nach fünfstündiger Autolyse (bei 37° und p_H 7,4) auf 0,085 g P_2O_5, also um 70 Proz.; nach Zusatz von Traubenzucker zu 0,167 bzw. 0,675 und 1,67 Proz. (auf die Form-

Tabelle VIII.

37°. Hämatokritwert: 33 Proz. Formelemente, 67 Proz. Ringerlösung.

	Traubenzuckermenge g in 100 g Formelementen		p_H		P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
	sofort	nach 5 Std.			Anorg. P	Gesamt-P	Phosphorsäureester
1	0,076		7,36	sofort	0,0506	0,1662	0,1156
2	0,061	0,061	7,35	nach 5 Std.	0,0858	0,1650	0,0792
3	0,073	0,076	7,36	nach 5 Std.	0,0860	0,1650	0,0790
4*	0,076	0,067	6,25	nach 5 Std.	0,0855	0,1650	0,0795
5 mit Traubenzuckerzusatz	0,167	0,082	7,25	nach 5 Std.	0,0630	0,1652	0,1020
6 mit Traubenzuckerzusatz	0,675	0,521	7,21	nach 5 Std.	0,0591	0,1652	0,1061
7 mit Traubenzuckerzusatz	1,670	1,530	7,16	nach 5 Std.	0,0591	0,1650	0,1061

* Zusatz von Essigsäure.

Tabelle IX.

Zusammensetzung: In allen Versuchen 9,0 ccm „Blutkörperchenflüssigkeit" (bestehend aus Blutkörperchen aus 100 g Blut + 20 ccm Ringerlösung). In 5 bis 8 Zuckerzusatz (in 5 0,3 ccm, in 6 und 7 0,7 ccm etwa 5proz., in 8 1,5 ccm etwa 20proz. Traubenzuckerlösung). In 9 bis 12 Serumzusatz 20 ccm. Ferner in den Versuchen 4, 7, 10 und 12 je 0,6 ccm n Essigsäure. Jeder Versuch wird mit Ringer auf 30 ccm aufgefüllt („Blutkörperchensuspension"). Hämatokritwert: 24 Proz. Formelemente, 76 Proz. Ringerlösung.

	Traubenzucker g in 100 g „Blutkörperchensuspension"		p_H		P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
	sofort	nach 5 Std. bei 37°			Anorg. P	Gesamt-P (Autoklavenwert)	Phosphorsäureester
1	—	—	7,21	sofort	0,0595	0,177	0,1175
2	0,014	0,012	7,17	nach 5 Stunden	0,1007	0,177	0,0766
3	0,016	0,014	7,22	nach 5 Stunden	0,1024	0,177	0,0755
4*	0,016	0,014	5,87	nach 5 Stunden	0,1000	0,181	0,0812
5 mit Traubenzuckerzusatz	0,063	0,014	7,12	nach 5 Stunden	0,0754	0,176	0,1000
6 mit Traubenzuckerzusatz	0,128	0,074	7,07	nach 5 Stunden	0,0733	0,179	0,1075
7* mit Traubenzuckerzusatz	0,129	0,131	5,44	nach 5 Stunden	0,0925	0,179	0,0875
8 mit Traubenzuckerzusatz	0,817	—	7,05	nach 5 Stunden	0,0695	0,177	0,1076
9 mit Serumzusatz**	0,131	0,076	7,39	nach 5 Stunden	0,0633	0,177	0,0858
10* mit Serumzusatz**	0,129	0,131	6,16	nach 5 Stunden	0,0965	0,183	0,0650
11 mit Serumzusatz**	0,135	0,080	—	nach 5 Stunden	0,0662	0,178	0,1118
12* mit Serumzusatz**	—	0,128	—	nach 5 Stunden	0,0937	0,182	0,0650

* Essigsäurezusatz.
** Serum: Traubenzuckergehalt 0,167 Proz., Anorg. P: 0,0101 Proz., Gesamt-P: 0,011 Proz.

elemente berechnet) stieg der anorganische P-Wert nur um 26 bzw. 18 Proz. Auch hier blieb die in den gewaschenen Blutkörperchen vorhandene Restreduktion von der Glykolyse verschont. Bemerkenswert

ist in diesem, wie in allen anderen Versuchen der außerordentlich konstante Wert an Gesamt-P in den Blutkörperchen, der in einem und demselben Versuch kaum um einige Prozente schwankt und im allgemeinen 0,17 bis 0,18 Proz. beträgt.

Im Versuch 3 (vgl. Tabelle IX) ist das Verhalten des Traubenzuckerzusatzes in Ringer mit dem eines Zuckerzusatzes in Serum verglichen. Ein Unterschied ist nicht wahrzunehmen: das Serum verhält sich in bezug auf den Phosphatumsatz wie eine Traubenzuckerlösung. Der ursprüngliche Wert an anorganischem Phosphat stieg nach 5 Stunden (bei 37° und p_H 7 bzw. p_H 6) um etwa 70 Proz., bei Zusatz von Traubenzucker von etwa 0,130 Proz. nur um 23 bzw. 6 Proz. Aber bemerkenswerterweise nur bei p_H 7; bei p_H 6 ist kaum ein Unterschied gegen die Versuche ohne Zuckerzusatz zu verzeichnen. Die Verschiebung des Gleichgewichts ist also an einen bestimmten p_H gebunden.

Tabelle X.

Zusammensetzung: Je 10 ccm „Blutkörperchenflüssigkeit“ (vgl. Tabelle IV). Dann Zusatz von je 1,5 ccm Lösung in 4 und 5 von Glucose (Endkonzentration 0,125 Proz.); in 6 und 7 von Lävulose (Endkonzentration 0,125 Proz.); in 8 und 9 von Galaktose (Endkonzentration 0,125 Proz.); von 10 und 11 Lactose (Endkonzentration 0,25 Proz.); in 12 und 13 von Maltose (Endkonzentration 0,25 Proz.); von 14 und 15 Saccharose (Endkonzentration 0,25 Proz.); in 16 und 17 von Glycerin (Endkonzentration 0,33 Proz.). In den Versuchen 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 wurden 0,4 ccm n Essigsäure zugefügt. Alle Versuche wurden mit Ringerlösung auf 12 ccm aufgefüllt. Hämatokritwert: 34 Proz. Formelemente, 66 Proz. Ringerlösung. 37°.

		p_H		P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
				Anorgan. P	Gesamt-P (Autoklavenwert)	Phosphorsäureester
1		7,24	sofort	0,0465	0,1708	0,1127
2		7,17	nach 5 Stunden	0,1070	0,1704	0,0634
3*		5,05		0,0780	0,1730	0,0950
4	+ Glucose	7,19		0,0742	0,1681	0,0939
5*		4,98		0,0742	0,1718	0,0976
6	+ Lävulose	7,0		0,0732	0,1662	0,0930
7*		5,0		0,0769	0,1718	0,0949
8	+ Galaktose	7,0		0,0942	0,1685	0,0743
9*		5,0		0,0765	0,1700	0,0935
10	+ Laktose	7,0		0,1082	0,1718	0,0636
11*		5,0		0,0769	0,1718	0,0949
12	+ Maltose	7,0		0,1080	0,1718	0,0638
13*		5,0		0,0818	0,1718	0,0900
14	+ Saccharose	7,0		0,1114	0,1698	0,0584
15*		5,0		0,0778	0,1605	0,0827
16	+ Glycerin	7,0		0,1104	0,1687	0,0583
17*		5,0		0,0795	0,1718	0,0923

* Essigsäurezusatz.

3. Ehe die Rolle der Wasserstoffionenkonzentration auf den Vorgang der Esterspaltung und -synthese einer genauen Prüfung unterzogen wurde, mußte untersucht werden, wie andere Zuckerarten die Phosphatasewirkung beeinflussen. Die folgenden drei Versuchsreihen zeigen, daß nur Glucose, Fructose und Mannose, dann in geringem Grade auch Galaktose das Gleichgewicht nach der Richtung der Synthese verschieben; alle die untersuchten Disaccharide, ferner Glycerin waren ohne, milchsaures Natrium und brenztraubensaures Natrium fast ohne Wirkung. Die Zunahme des anorganischen Phosphats betrug im Versuch 3 (Tabelle X) nach fünfstündiger Autolyse (bei 37° und p_H 7) etwa 130 Proz., gleich ob ohne oder mit Zusatz der letztgenannten Verbindungen, während bei Glucose und Lävulosezusatz diese nur etwa

Tabelle XI.

Zusammensetzung: Je 12 ccm „Blutkörperchen-Ringerlösung" (vgl. Tabelle IV). Hierzu Zusatz von je 1,5 ccm Lösung von in 4 und 5 d-Glucose (Endkonzentration 0,15 Proz.); in 6 und 7 d-Lävulose (Endkonzentration 0,15 Proz.); in 8 und 9 d-Galaktose (Endkonzentration 0,15 Proz.); in 10 und 11 Saccharose (Endkonzentration 0,3 Proz.); in 12 und 13 Lactose (Endkonzentration 0,3 Proz.); in 14 und 15 Maltose (Endkonzentration 0,3 Proz.); in 16 und 17 brenztraubensaures Natrium (Endkonzentration 0,15 Proz.); in 18 und 19 milchsaures Natrium (Endkonzentration 0,15 Proz.). In den Versuchen 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 je 0,25 ccm n Essigsäure. Alle Versuche werden mit Ringerlösung auf 15 ccm aufgefüllt. Hämatokritwert der „Blutkörperchensuspension": 30 Proz. Formelemente, 70 Proz. Lösung. 37°.

		p_H		P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
				Anorgan. P	Gesamt-P (Autoklavenwert)	Phosphorsäureester
1		7,21	sofort	0,0627	0,1843	0,1216
2		7,19	nach 5 Stunden	0,1180	0,1850	0,0670
3*		6,42		0,1147	0,1853	0,0706
4	Zusatz von *d*-Glucose	7,2		0,0797	0,1857	0,1060
5*		6,4		0,1160	0,1877	0,0717
6	Zusatz von *d*-Lävulose	7,1		0,0807	0,1843	0,1036
7*		6,4		0,1147	0,1870	0,0723
8	Zusatz von *d*-Galaktose	7,2		0,1020	0,1823	0,0803
9*		6,4		0,1153	0,1853	0,0700
10	Zusatz von Saccharose	7,2		0,1167	0,1843	0,0676
11*		6,4		0,1150	0,1843	0,0693
12	Zusatz von Laktose	7,2		0,1173	0,1853	0,0680
13*		6,4		0,1140	0,1870	0,0730
14	Zusatz von Maltose	7,2		0,1173	0,1857	0,0684
15*		6,4		0,1147	0,1870	0,0723
16	Zusatz v. brenztraubensaurem Na 2,25 ccm	7,2		0,1053	0,1857	0,0804
17*		6,4		0,1137	0,1877	0,0743
18	Zusatz von milchsaurem Na 2,25 ccm	7,2		0,1023	0,1870	0,0847
19*		6,4		0,1143	0,1878	0,0735

* Zusatz von Essigsäure.

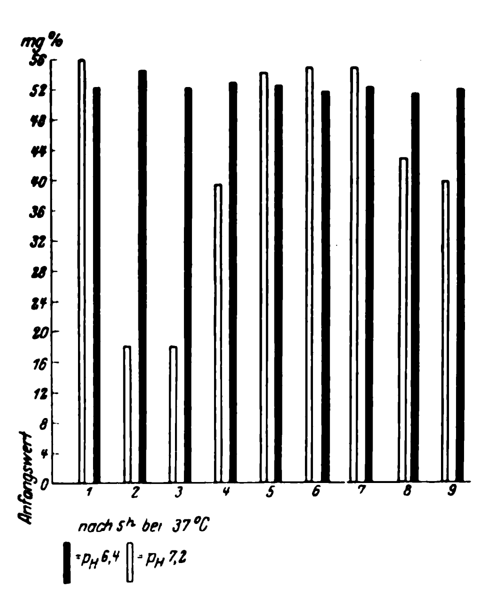


Abb. 2 (zu Tabelle XI).

1. Kontrolle ohne Zuckerzusatz. 2. Zusatz von Glucose, 3. von Lävulose, 4. von Galaktose, 5. von Saccharose, 6. von Lactose, 7. von Maltose, 8. von brenztraubensaurem Natrium, 9. von milchsaurem Natrium.

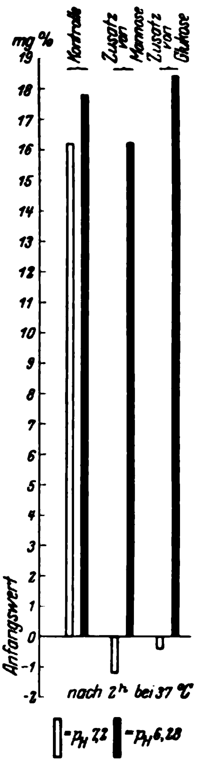


Abb. 3 (zu Tabelle XII).

Tabelle XII.

Die Formelemente aus 100 g defibriniertem Kaninchenblut werden zweimal mit Ringerlösung gewaschen, schließlich mit Ringer auf 100 ccm aufgefüllt. Hämatokritwert: Formelemente 31 Proz., Ringer 69 Proz. Zu jeder Probe 10 ccm Blutkörperchenmischung. Zu den Proben 3, 5 und 7 je 1 ccm n/5 Essigsäure. 37°. Dauer 2 Stunden.

		p_H		P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
				Anorgan. P	Gesamt-P (Autoklavenwert)	Phosphorsäureester
1	Anfangswert			0,0290	0,197	0,1680
2		7,20	nach 2 Std.	0,0452	0,195	0,1498
3		6,28		0,0468	0,197	0,1502
4	je 1,0 ccm 1 proz. Mannose	7,20		0,0278	0,195	0,1672
5		6,28		0,0452	0,197	0,1518
6	je 1,0 ccm 1 proz. Glucose	7,20		0,0286	0,197	0,1684
7		6,28		0,0474	0,198	0,1506

Tabelle XIII.

Zusammensetzung: Je 10 ccm „Blutkörperchen-Ringerlösung“ (vgl. Tabelle IV). Dazu in den Versuchen 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 je 1 ccm 2proz. d-Glucose, im Versuch 18 brenztraubensaures Na (5proz., 2,6 ccm), im Versuch 19 milchsaures Natrium (5proz., 2,6 ccm); ferner in 2 und 3 je 2 ccm n/2 $NaHCO_3$; in 6 und 7 0,10 ccm, in 8 und 9 0,15 ccm, in 10 und 11 0,20 ccm, in 12 und 13 0,25 ccm, in 14 und 15 0,30 ccm, in 16 und 17 0,35 ccm n Essigsäure. Alle Versuche werden mit Ringerlösung auf 13 ccm aufgefüllt. Hämatokritwert: 33 Proz. Formelemente, 67 Proz. Ringerlösung. 37⁰.

		p_H		P_2O_5 g in 100 g Formelementen			Zunahme des anorg. Phosphors
				Anorgan. P nach *Embden*	Gesamt-P (Autoklavenwert) nach *Lieb*	Phosphorsäureester	Proz.
1		—	sofort	0,0282	0,1840	0,1558	
2		7,75	nach 2 Stunden	0,0643	0,1840	0,1197	128
3	+ Glucose	—		0,0249	0,1850	0,1601	—12
4		7,30		0,0570	0,1830	0,1261	102
5	+ „	—		0,0287	0,1846	0,1559	2
6		6,89		0,0579	0,1830	0,1251	105
7	+ „	—		0,0556	0,1848	0,1292	103
8		6,61		0,0599	0,1850	0,1251	113
9	+ „	—		0,0563	0,1862	0,1299	100
10		6,34		0,0615	0,1875	0,1260	118
11	+ „	—		0,0563	0,1875	0,1312	100
12		5,98		0,0595	0,1900	0,1305	111
13	+ „	—		0,0578	0,1890	0,1312	105
14		5,80		0,0605	0,1900	0,1295	115
15	+ „	—		0,0577	0,1882	0,1305	104
16		5,44		0,0618	0,1882	0,1264	120
17	+ „	—		0,0565	0,1890	0,1325	101

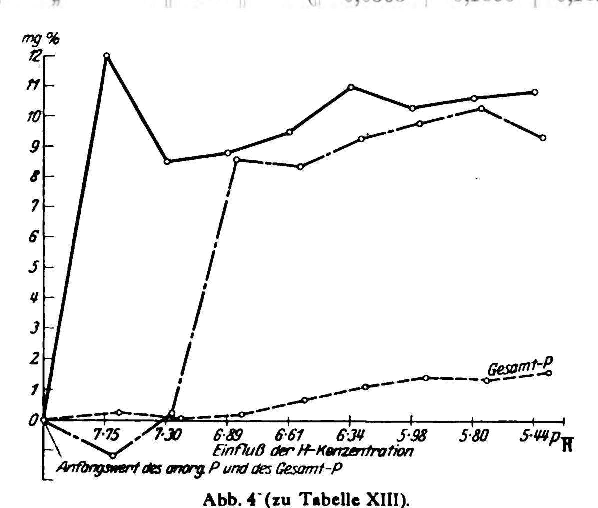


Abb. 4 (zu Tabelle XIII).
——— Zunahme des anorg. P ohne Zuckerzusatz.
- - - „ „ „ P mit „
—•—•— „ „ Gesamt-P nach 2 Stunden bei 37⁰.

Tabelle XIV.

Zusammensetzung: Je 10 ccm Blutkörperchen-Ringerlösung. Vom Versuch 3 an Zusatz aufsteigender Mengen n/5 Essigsäure (von 0,375 bis 1,75 ccm). Alle Versuche mit Ringer auf 15 ccm aufgefüllt. 2 Stunden bei 37°. Hämatokritwert: 28 Proz. Formelemente, 72 Proz. Ringerlösung.

p_H			P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
			Anorgan. P nach *Embden*	Gesamt-P (Autoklavenwert) nach *Lieb*	Phosphorsäureester
7,45	Anfangswert		0,0236	0,211	0,1874
7,42		nach 2 Stunden	0,0490	0,209	0,1600
7,42	Zusatz von Glucose		0,0261	0,211	0,1849
7,19			0,0497	0,209	0,1593
7,19	" " "		0,0361	0,210	0,1739
6,91			0,0503	0,211	0,1607
6,91	" " "		0,0447	0,210	0,1653
6,46			0,0503	0,212	0,1612
6,46	" " "		0,0496	0,214	0,1644
5,96			0,0525	0,212	0,1595
5,96	" " "		0,0517	0,214	0,1623
5,80			0,0517	0,214	0,1623
5,80	" " "		0,0521	0,212	0,1599
5,63			0,0517	0,214	0,1635
5,63	" " "		0,0525	0,216	0,1623
5,29			0,0514	0,216	0,1646
5,29	" " "		0,0517	0,216	0,1643

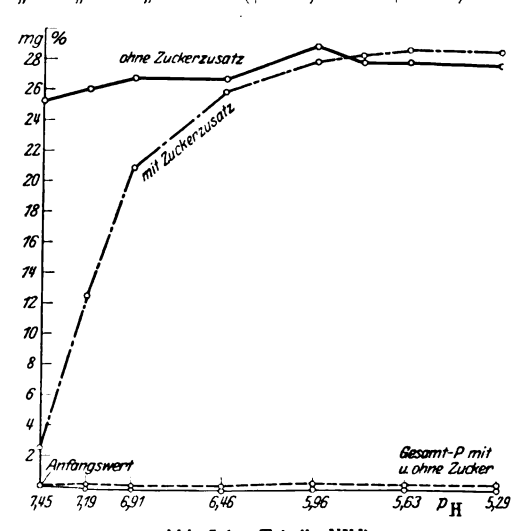


Abb. 5 (zu Tabelle XIV).
Zuwachs an anorg. P nach 2 Stunden bei 37°.

60 Proz., bei Galaktose 100 Proz. beträgt. Der Vergleich der Wirkung bei einem p_H 7 und bei einem niedrigeren ist in Versuch 5 nicht gut verwertbar, da bei p_H 5 die Phosphatase schon stark geschädigt wird.

Klarer liegen die Verhältnisse im Versuch, der in Tabelle XI wiedergegeben ist. Auch hier ist die Übereinstimmung in der Wirkung von Glucose und Fructose vorhanden, während alle die anderen Zuckerarten, wie auch Milchsäure und Brenztraubensäure unwirksam waren. Bei diesen, wie auch im Versuch ohne Kohlehydratzusatz war die fermentative Zunahme des anorganischen P (bei 37° und p_H 7 und 6) etwa 90 Proz., in den Versuchen mit Glucose und Fructose nur 25 Proz.; dies ist aber nur der Fall bei p_H 7; bei p_H 6,4 war kein Unterschied, ob man Glucose oder Fructose zugefügt hat oder nicht. Die Wirkung der Mannose, die mit der der Glucose übereinstimmt, zeigt Versuch Tabelle XII.

Tabelle XIV a.

Zusammensetzung: Je 10 ccm Blutkörperchen-Ringersuspension. Zusatz von d-Glucose 1,0 ccm (2proz. Lösung, Endkonzentration 0,15 Proz.). Bei p_H 8 Zusatz von 2 ccm n/2 $NaHCO_3$; bei p_H 6 Zusatz von 0,25 ccm n Essigsäure. Alle Versuche mit Ringer auf 13 ccm aufgefüllt. Hämatokritwert: 34 Proz. Formelemente, 66 Proz. Ringerlösung.

			P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
			Anorgan. P nach *Embden*	Gesamt-P (Autoklavenwert) nach *Lieb*	Phosphorsäureester
Anfangswert			0,0204	0,207	0,1829
2 Std. bei 0°	p_H 8		0,0350	0,208	0,1730
		mit Glucose	0,0221	0,207	0,1849
	p_H 7		0,0253	0,207	0,1817
		mit Glucose	0,0236	0,209	0,1854
	p_H 6		0,0350	0,212	0,1770
		mit Glucose	0,0238	0,208	0,1842
2 Std. bei 37°	p_H 8		0,0664	0,211	0,1146
		mit Glucose	0,0229	0,212	0,1891
	p_H 7		0,0660	0,209	0,1430
		mit Glucose	0,0350	0,208	0,1730
	p_H 6		0,0591	0,211	0,1519
		mit Glucose	0,0600	0,212	0,1520
2 Std. bei 50°	p_H 8		0,0755	0,216	0,1405
		mit Glucose	0,0526	0,215	0,1624
	p_H 7		0,0708	0,213	0,1422
		mit Glucose	0,0567	0,214	0,1573
	p_H 6		0,0670	0,214	0,1470
		mit Glucose	0,0667	—	—

4. Die obigen Versuche deuten an, daß die Verschiebung des Gleichgewichts in der Richtung der Synthese nur bei alkalischer Reaktion zu beobachten ist; schon bei p_H 6,4 war sie nicht mehr vorhanden. Genauere Aufklärung hierüber geben die Versuche mit den entsprechenden Tabellen XIII und XIV. In diesen wurde der Zusatz gleicher Mengen Glucose unter sonst gleichen Bedingungen bei variiertem p_H von 7,75 bzw. 7,42 bis 5,44 bzw. 5,29 geprüft. Wie man sieht, ist der p_H-Bereich der Gleichgewichtsverschiebung sehr eng: bei p_H 6,46 ist es vollkommen gleich, bei p_H 6,9 fast gleich, ob ein Glucosezusatz erfolgt war oder nicht, während bei p_H 7,30 die Spaltung nach Zuckerzusatz vollkommen (im Versuch 20 so gut wie vollkommen) aufgehoben ist[1]). Über ähnliche Beobachtungen von Verschiebungen der Gleichgewichtslage bei verschiedenem p_H berichten auch *Euler* und *Josephson*[2]).

Über den Einfluß der Temperatur gibt Tabelle XIVa Aufschluß. Hierzu ist zu bemerken, daß bei 50° bereits eine allmähliche Hämolyse eintritt und die stärkere Esterspaltung (beim Zuckerversuch) im Vergleich mit der Spaltung bei 37° zum Teil auf die Hämolyse zurückzuführen ist. Will man die Temperaturwirkung bei 37° und bei 50° miteinander vergleichen, so muß man mit hämolysiertem Blute arbeiten, wie dies in Tabelle XIVb geschildert ist. Bei 0° ist die Phosphatasewirkung nur sehr gering.

Tabelle XIVb.

Zusammensetzung: Je 10 ccm Blutkörperchen-Ringersuspension, dann Zusatz von 15 ccm destillierten Wassers. In allen Versuchen Hämolyse. Versuchsdauer in 1 und 3 30 Minuten, in 2 und 4 60 Minuten. Hämatokritwert in der ursprünglichen Suspension: 37 Proz. Formelemente, 63 Proz. Ringerlösung.

		P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
		Anorg. P (nach *Embden*)	Gesamt-P (Autoklavenwert) nach *Lieb*	Phosphorsäureester
Anfangswert . . .		0,0201	0,166	0,1450
37°	1	0,0375	0,169	0,1315
	2	0,0426	0,172	0,1294
50°	3	0,0376	0,170	0,1324
	4	0,0548	0,169	0,1142

Die Spaltung von Px war demnach (im hämolysierten Blute) bei 50° etwas größer als bei 37°.

---

[1]) In Übereinstimmung mit der Angabe von *M. Martland*, Biochem. Journ. **19**, 117, 1925.

[2]) *H. v. Euler* und *K. Josephson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **136**, 30 [42], 1924; vgl. jedoch auch *R. Kuhn*, ebendaselbst **125**, 28, 1923.

Tabelle XV.

Zusammensetzung: Je 10 ccm Blutkörperchen-Ringerlösung. Bei p_H 9 Zusatz von 1,5 ccm Carbonat/Bicarbonatpuffer ($^2/_3$ mol.; 7 : 3). Bei Glucosezusatz: Zusatz von je 1,0 ccm 2proz. Glucoselösung. Alle Versuche mit Ringer auf 15,0 ccm aufgefüllt. 1 Stunde 45 Minuten bei 37°. Hämatokritwert: Formelemente 28 Proz., Ringerlösung 72 Proz.

		P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
		Anorgan. P nach *Embden*	Gesamt-P (Autoklavenwert) nach *Embden*	Phosphorsäureester
Anfangswert		0,0323	0,198	0,1657
p_H 7,30	—	0,0501	0,198	0,1479
p_H 7,30	Zusatz v. Glucose	0,0318	0,198	0,1672
p_H 9,00	—	0,0486	0,199	0,1504
p_H 9,05	Zusatz v. Glucose	0,0233	0,200	0,1762

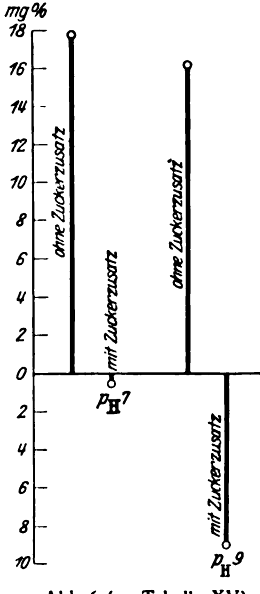


Abb. 6 (zu Tabelle XV).

Tabelle XVI.

Zusammensetzung: Je 10 ccm Blutkörperchen-Ringerlösung. In den Versuchen mit p_H 8,95 Zusatz von 1,5 ccm Carbonat/Bicarbonatpuffer ($^2/_3$ mol.; 7 : 3), in Versuchen mit p_H 9,65 von Carbonat/Bicarbonatpuffer 3 : 7. Bei Glucosezuastz: Zusatz von je 1,0 ccm 2proz. Glucoselösung. Alle Versuche mit Ringer auf 15,0 ccm aufgefüllt. Versuche 1, 3, 5, 7, 9, 11 30 Minuten, die anderen 90 Minuten bei 37°. Hämatokritwert: Formelemente 32,5 Proz., Ringer 67,5 Proz.

Anorganisches P (als P_2O_5) nach *Embden* in 100 g Formelementen												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anfangswert	p_H 7,4				p_H 8,95				p_H 9,65			
	—	—	Zusatz von Glucose	Zusatz von Glucose	—	—	Zusatz von Glucose	Zusatz von Glucose	—	—	Zusatz von Glucose	Zusatz von Glucose
0,0255	0,0321	0,0455	0,0207	0,0250	0,0351	0,0492	0,0197	0,0224	0,0343	0,0381	0,0270	0,0321

Betrachtet man die alkalische Seite, so sieht man aus den Versuchen (Tabelle XV und XVI), daß die Synthese nach Zuckerzusatz bei p_H 8 bis 9 stärker ist als bei p_H 7, ohne Zuckerzusatz ist aber auch die fermentative Spaltung größer als bei p_H 7. Der Befund in der vorherigen Mitteilung, das Optimum der Phosphatase liege bei p_H 6, war

Tabelle XVII.

Zusammensetzung: Je 9,0 ccm Blutkörperchen-Ringersuspension. Bei p_H 7,7 Zusatz von 1,5 ccm $^2/_3$ mol. $NaHCO_3$. Bei p_H 6,0 Zusatz von 1,5 ccm n/5 Essigsäure. Bei Glucosezusatz: Zusatz von 1,0 ccm 3 proz. Glucose. Hämatokritwert: 37,5 Proz. Formelemente, 62,5 Proz. Ringerlösung.

		P_2O_5 g in 100 g Formelementen			Bemerkungen
		Anorgan. P (nach *Embden*)	Gesamt-P (Autoklavenwert) nach *Lieb*	Phosphorsäureester	
Anfangswert . . .		0,0386	0,195	0,1564	
p_H 7,7 37°		0,0472	0,195	0,1478	Nach 45′ unterbrochen
		0,0584	0,195	0,1366	Nach 90′ unterbrochen
	Zusatz von Glucose	0,0301	—	—	Nach 45′ unterbrochen
	Zusatz von Glucose	0,0324	—	—	Nach 90′ unterbrochen
p_H 6 37°	Zusatz von Glucose	0,0493	—	—	Nach 45′ unterbrochen
	Zusatz von Glucose	0,0552	—	—	Nach 90′ unterbrochen
	Zusatz von Glucose	0,0474	—	—	Nach 45′ 2,0 ccm $^2/_3$ mol. $NaHCO_3$ zugefügt (p_H auf 7,13 gebracht), dann nach weiteren 45′ unterbrochen
p_H 6 37°		0,0541	0,195	0,1374	Nach 45′ unterbrochen
		0,0600	0,195	0,1350	Nach 90′ unterbrochen
		0,0602	0,197	0,1368	Nach 45′ 2,0 ccm $^2/_3$ mol. $NaHCO_3$ zugefügt (p_H auf 7,13 gebracht), dann nach weiteren 45′ unterbrochen

dadurch vorgetäuscht, daß bei dieser Reaktion die Estersynthese bereits wegfällt. Bei p_H 10 (Versuch 9 bis 12) ist schon starke Hämatinbildung; die Phosphatasewirkung ist bei diesem p_H stark geschwächt.

5. Die beobachtete Verschiebung des Gleichgewichts ist reversibel. Läßt man den Versuch mit und ohne Glucose eine bestimmte Zeit bei p_H 6 verlaufen und schaltet man dann durch Zusatz von Bicarbonat den Versuch auf p_H 7 um (Tabelle XVII und XVIII), so sieht man, daß in Fällen ohne Zuckerzusatz die Spaltung des Phosphorsäureesters ganz gleichartig verläuft; die Kurven bei p_H 6 und 7 decken sich. Anders bei Zuckerzusatz. Hier entsteht ein Knick in der Kurve, die Spaltung

nimmt ab, obgleich ohne Zuckerzusatz die Spaltung bei p_H 7 stärker ist als bei p_H 6. Vgl. Abb. zu Tabellen XVII und XVIII.

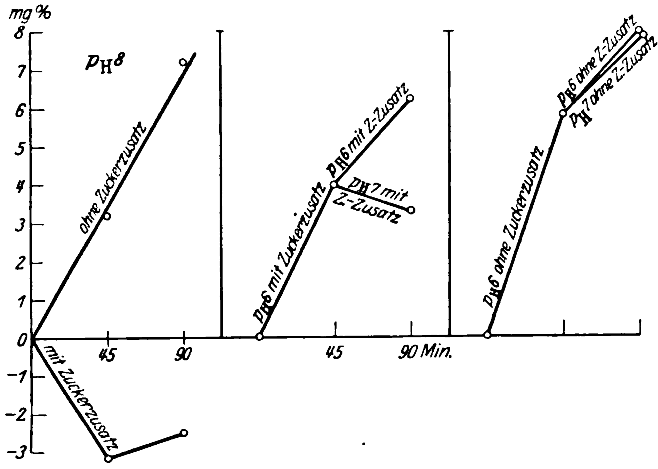


Abb. 7 (zu Tabelle XVII).

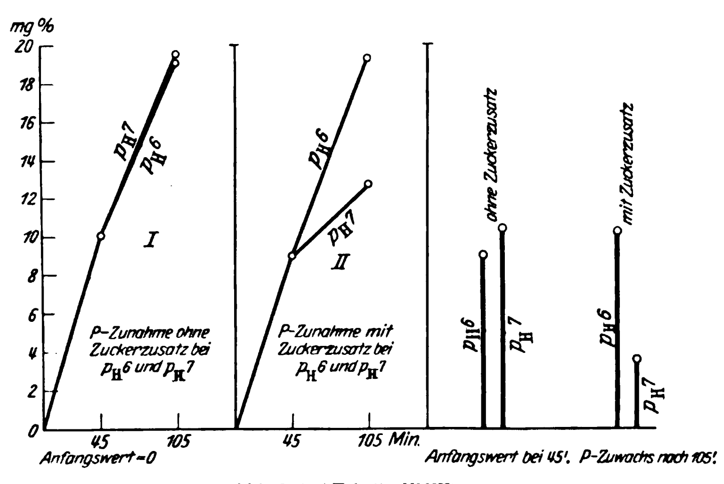


Abb. 8 (zu Tabelle XVIII).

6. Frühere Versuche haben gezeigt[1]), daß die Glykolyse, die ebenfalls nur in den Formelementen und nicht im Plasma vor sich geht, ebenfalls sehr stark von dem p_H abhängt. Bei p_H 6,4 war sie nicht mehr nachzuweisen, und bei p_H 6,7 war sie schon stark vermindert.

[1]) *P. Rona* und *G. G. Wilenko*, diese Zeitschr. 62, 1, 1914.

Tabelle XVIII.

Zusammensetzung: Je 10 ccm Blutkörperchen-Ringerlösung. Bei p_H 5,6 Zusatz von 1,5 ccm n/5 Essigsäure. Bei Glucosezusatz: Zusatz von 1,0 ccm 3proz. Glucoselösung. Alle Versuche auf 13 ccm mit Ringerlösung aufgefüllt. (Nach 45 Minuten mit 2,0 ccm $^2/_3$ mol. $NaHCO_3$ bzw. 2,0 ccm Ringer ergänzt.)
Hämatokritwert: 28 Proz. Formelemente, 72 Proz. Ringerlösung.

		P_2O_5 g in 100 g Formelementen			Bemerkungen
		Anorgan. P (nach *Embden*)	Gesamt-P (Autoklavenwert) nach *Embden*	Phosphorsäureester	
Anfangswert . . .		0,0323	0,198	0,1747	
p_H 7, 37°		0,0389	0,198	0.1591	Nach 45′ unterbrochen
		0,0489	0,196	0,1471	Nach 105′ unterbrochen
	Zusatz von Glucose	0,0232	0,197	0,1738	Nach 45′ unterbrochen
	Zusatz von Glucose	0,0321	—	—	Nach 105′ unterbrochen
p_H 5,6, 37°		0,0425	—	—	Nach 45′ unterbrochen
		0,0515	—	—	Nach 105′ unterbrochen
		0,0529	0,198	0,1451	Nach 45′ mit 2,0 ccm $^2/_3$ mol. $NaHCO_3$ versetzt (p_H auf 7,06 gebracht), dann nach 105′ unterbrochen
p_H 5,6, 37°	Zusatz von Glucose	0,0414	—	—	Nach 45′ unterbrochen
	Zusatz von Glucose	0,0516	0,199	0,1474	Nach 105′ unterbrochen
	Zusatz von Glucose	0,0450	0,200	0,1550	Nach 45′ mit 2,0 ccm $^2/_3$ mol. $NaHCO_3$ zersetzt (p_H auf 7,09 gebracht), dann nach 105′ unterbrochen.

Dieses gleichartige Verhalten des Phosphatumsatzes und der Glykolyse[1]) zunächst in bezug auf den Einfluß der H-Konzentration führte dazu, auch andere Faktoren, die die Glykolyse hemmen, auf ihre Wirkung auf die Gleichgewichtsverschiebung nach Zuckerzusatz zu untersuchen. Solche Faktoren sind: Hämolyse, Zusatz von F Na. Wie die Versuche (Tabellen XIX und XX) und Abbildung (zu Tabelle XIX) zeigen, war die Übereinstimmung im Hinblick auf das Ausbleiben der Glykolyse und das Ausbleiben einer synthetischen Wirkung des zugesetzten Zuckers in allen Fällen vorhanden. Die fermentative Zerlegung von Px ist im hämolysierten Blute hingegen sehr stark, wie dies die Tabelle XIXa zeigt.

[1]) Vgl. hierzu namentlich *M. Martland*, *F. G. Hausmann* und *R. Robison*, Biochem. Journ. 18, 1152, 1924.

Tabelle XIX.

Zusammensetzung: Je 10 ccm Blutkörperchen-Ringerlösung. In den Versuchen mit Hämolyse Zusatz von 10 ccm destillierten Wassers; in den Versuchen mit NaF Zusatz von 1,5 ccm 4proz. NaF-Lösung; in den Versuchen bei p_H 6 Zusatz von 1,5 ccm n/5 Essigsäure (sonst überall p_H 7,4). Alle Versuche mit Ringer auf 15 ccm aufgefüllt. Versuchsdauer in 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 16, 18 30 Minuten, sonst 60 Minuten bei 37°. Hämatokritwert: 37 Proz. Formelemente, 63 Proz. Ringerlösung.

			P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
			Anorgan. P (nach *Embden*)	Gesamt-P (Autoklavenwert) nach *Lieb*	Phosphorsäureester
Anfangswert			0,0210	0,166	0,1450
1	Kontrolle		0,0305	0,173	0,1425
2	Kontrolle		0,0377	0,171	0,1333
3	Kontrolle	Zusatz von Glucose	0,0198	0,167	0,1472
4	Kontrolle	Zusatz von Glucose	0,0266	0,166	0,1394
5	Hämolyse		0,0375	0,169	0,1315
6	Hämolyse		0,0426	0,172	0,1294
7	Hämolyse	Zusatz von Glucose	0,367	0,168	0,1313
8	Hämolyse	Zusatz von Glucose	0,0416	0,169	0,1274
9	Zusatz von FNa		0,0292	0,169	0,1398
10	Zusatz von FNa		0,0354	0,173	0,1376
11	Zusatz von FNa	Zusatz von Glucose	0,0284	0.169	0,1406
12	Zusatz von FNa	Zusatz von Glucose	0,0321	0,173	0,1409
13	p_H 6		0,0386	0,169	0,1304
14	p_H 6	Zusatz von Glucose	0,0272	0,171	0.1438
15	p_H 6	Zusatz von Glucose	0,0386	0,169	0,1304

Weiterhin mußte erwartet werden, daß die Umkehrbarkeit der Wirkung durch Änderung des p_H, wie dies bei der Phosphatase zu beobachten war, auch bei der Glykolyse vorhanden sein müßte. Dies ist tatsächlich der Fall. Bei diesen Versuchen wurde das Blut (Blutkörperchen + Ringerlösung) nachdem der Zuckergehalt festgestellt war, auf p_H 6,30 gebracht, und der Zuckergehalt nach 45, 60 und 120 Minuten langem Stehen bei diesem p_H untersucht. Es trat keine Änderung des Zuckergehalts ein. Brachte man nun die Reaktion in einzelnen Proben nach 45, 60 und 120 Minuten auf p_H 7 und prüfte den Zuckergehalt nach 45, 90 und 180 Minuten, so fand man in allen Fällen eine bedeutende Glykolyse, und zwar von gleichartigem Verlauf [1]).

[1]) Tabellen XXI und XXII (Abb. 10).

Tabelle XIXa.

Blutkörperchen von 180 g defibriniertem Kaninchenblut werden zweimal mit Ringerlösung gewaschen, dann mit Ringer auf 90 ccm aufgefüllt. Hämatokritwert: Formelemente 68 Proz., Ringerlösung 32 Proz. Zu jeder Probe 5,0 ccm Blutkörperchensuspension + 15 ccm destillierten Wassers (Hämolyse); Gesamtvolumen 25 ccm. Zu den Proben mit p_H 6,1 je 1 ccm n/5 Essigsäure. Dauer $2^1/_2$ Stunden.

		p_H		P_2O_5 in 100 g Formelementen		
				Anorg. P nach *Embden*	Gesamt-P (Autoklavenwert)	Phosphorsäureester
1	Anfangswert →			0,0366	0,191	0,1544
2	37°	7,2		0,0494	0,194	0,1446
3	37°	6,1		0,0542	0,197	0,1428
4	37°	7,2	+ 1,5 ccm 1 proz. Glucose	0,0496	0,197	0,1474
5	37°	6,1	+ 1,5 ccm 1 proz. Glucose	0,0548	0,197	0,1422
6	50°	7,2		0,0540	0,197	0,1430
7	50°	6,1		0,0580	0,197	0,1390
8	50°	7,2	+ 1,5 ccm 1 proz. Glucose	0,0536	0,197	0,1434
9	50°	6,1	+ 1,5 ccm 1 proz. Glucose	0,0598	0,196	0,1352

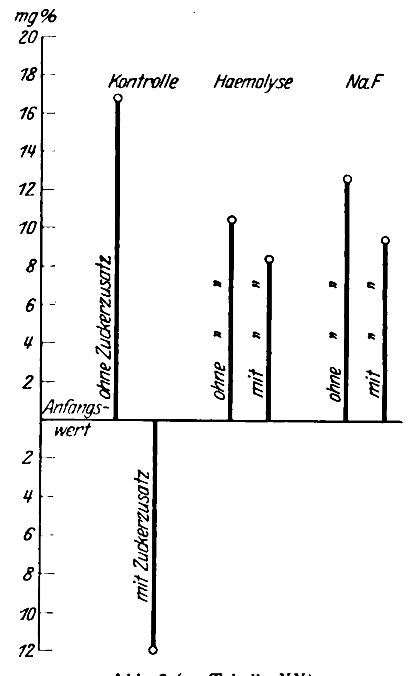


Abb. 9 (zu Tabelle XX).

Tabelle XX. Zusammensetzung: Je 10 ccm Blutkörperchen-Ringerlösung. In allen Versuchen je 1,0 ccm Carbonat/Bicarbonatpuffer ($^2/_3$ mol.; p_H 9,03). 1 Stunde 30 Minuten bei 37°. Hämatokritwert: 32 Proz. Formelemente, 68 Proz. Ringer.

	P_2O_5 g in 100 g Formelementen		
	Anorg. P (nach *Embden*)	Gesamt-P (Autoklavenwert) nach *Lieb*	Phosphorsäureester
Anfangswert	0,0262	0,196	0,1698
+ 1,0 ccm Ringer	0,0431	0,195	0,1519
+ 1,0 ccm Ringer + 1,0 ccm 2 proz. Glucose	0,0143	0,195	0,1807
+ 9,0 ccm Ringer	0,0466	0,196	0,1494
+ 8,0 ccm Ringer + 1,0 ccm Glucose	0,0191	0,196	0,1769
+ 9,0 ccm dest. Wasser	0,0366	0,195	0,1584
+ 8,0 ccm dest. Wasser + 1,0 ccm d-Glucose	0,0346	0,197	0,1641
+ 8,0 ccm Ringer + 1,0 ccm 4 proz. NaF	0,0387	0,195	0,1563
+ 8,0 ccm Ringer + 1,0 ccm NaF + 1,0 ccm Glucose	0,0354	0,198	0,1626

Tabelle XXI. Blutkörperchensuspension: Defibriniertes Kaninchenblut Ringerlösung. Zusatz von Essigsäure: 60,0 ccm 15,0 ccm + 1,0 ccm defibriniertes Kaninchenblut + 4,0 ccm n Essigsäure. Puffer: 9,0 ccm $^2/_3$ n $NaHCO_3$ + 1,0 ccm $^2/_3$ n Na_2CO_3. 37°.

Traubenzuckergehalt (Proz.) vor der Neutralisation					Traubenzuckergehalt (Proz.) nach der Neutralisation			
p_H	sofort	nach 45 Min.	nach 60 Min.	nach 120 Min.	p_H	nach 45 Min.	nach 90 Min.	nach 180 Min.
7,40	0,093				7,40	0,086	0,068	0,052
6,30	0,092				7,29	0,083	0,068	0,052
6,30		0,092			7,26	0,081	0,070	0,061
6,30			0,093		7,24	0,081	0,066	0,061
6,30				0,090	7,23	0,079	0,065	0,057

Tabelle XXII. Zusammensetzung wie in Tabelle XXI.

Traubenzuckergehalt (Proz.) vor der Neutralisation					Traubenzuckergehalt (Proz.) nach der Neutralisation			
p_H	sofort	nach 45 Min.	nach 60 Min.	nach 120 Min.	p_H	nach 45 Min.	nach 90 Min.	nach 180 Min.
7,45	0,110				7,45	0,102	0,092	0,075
6,33	0,106				7,30	0,101	0,092	0,074
6,33		0,108			7,30	0,099	0,086	0,072
6,33			0,110		7,33	0,097	0,086	0,074
6,33				0,106	7,28	0,099	0,088	0,070

Das glykolytische Ferment erfuhr also in der Beobachtungszeit des Versuchs demnach keine Schädigung.

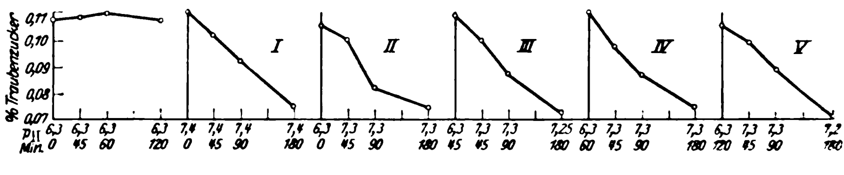


Abb. 10 (zu Tabelle XXII).

Vorher wurde gezeigt, daß die Estersynthese nur bei Zusatz von Glucose, Fructose und Mannose, in geringem Grade bei Zusatz von Galaktose stattfindet, nicht jedoch bei Zusatz der Disaccharide, Saccharose, Maltose und Lactose. Bei der Übereinstimmung des Verhaltens bei der Veresterung und bei der Glykolyse mußte erwartet werden, daß die erstgenannten Monosaccharide einer Glykolyse zugänglich, die Disaccharide jedoch nicht zugänglich sein würden. Dies ist, wie Tabelle XXIII und XXIV zeigen, tatsächlich auch der Fall.

Tabelle XXIII.

Formelemente von 60 g defibriniertem Kaninchenblut werden zweimal mit Ringerlösung gewaschen, schließlich mit Ringerlösung auf 50 ccm aufgefüllt. Bei 37° und $3\,^1/_2$ Stunden.

	Blutkörperchensuspension ccm	Ringer ccm	Glucose 0,6 proz. ccm	Lävulose 0,6 proz. ccm	Mannose 0,6 proz. ccm	Galaktose 0,6 proz. ccm	Maltose 0,6 proz. ccm	Lactose 0,6 proz. ccm	Reduktionswerte nach *Hagedorn-Jensen* Verbrauch von $^1/_{200}$ n Thiosulfat in ccm vorher	nachher	korrigiert (— 0,04)
1	5,0		1,0						1,32	1,49	1,45
2	5,0			1,0					1,36	1,52	1,48
3	5,0				1,0				1,32	1,48	1,44
4	5,0					1,0			1,48	1,57	1,53
5	5,0						1,0		1,48	1,51	1,47
6	5,0							1,0	1,50	1,54	1,50
7	5,0	1,0							1,87	1,91	

Nur diejenigen Kohlehydrate, die die Veresterung begünstigt haben, wurden auch „glykolysiert"; die anderen nicht[1])

Diese Versuche zeigen, daß die Monosaccharide bei p_H 6, wo auch keine Estersynthese stattfindet, nicht zerlegt werden, wohl aber bei

[1]) Vgl. hierzu *J. F. Irving*, Biochem. Journ. **20**, 1320, 1926; *A. Abraham*, Zeitschr. f. klin. Med. **104**, 609, 1926.

Tabelle XXIV.

Herstellung der Blutkörperchensuspension: 100 g defibriniertes Kaninchenblut wird zentrifugiert, die Formelemente zweimal mit Ringerlösung gewaschen, schließlich mit Ringerlösung auf 70 ccm gebracht. Je 5,0 ccm Blutkörperchensuspension. 3 Stunden bei 37°.

	p_H	0,25 n Essigsäure ccm	Glucose 0,6 Proz. ccm	Lävulose 0,6 Proz. ccm	Mannose 0,6 Proz. ccm	Galaktose 0,6 Proz. ccm	Maltose 0,6 Proz. ccm	Lactose 0,6 Proz. ccm	Ringerlösung ccm	Reduktionsbestimmung nach *Hagedorn-Jensen* 1/200 n-Thiosultatverbrauch vorher ccm	nachher ccm
Glucose	7		1,0							1,45	1,58
	6	1,0	1,0							1,43	1,45
Lävulose	7			1,0						1,44	1,56
	6	1,0		1,0						1,42	1,42
Mannose	7				1,0					1,42	1,60
	6	1,0			1,0					1,41	1,43
Galaktose	7					1,0				1,56	1,65
	6	1,0				1,0				1,55	1,57
Maltose	7						1,0			1,56	1,59
	6	1,0					1,0			1,56	1,59
Lactose	7							1,0		1,58	1,60
	6	1,0						1,0		1,57	1,59
Ohne Zucker	7								1,0	1,88	1,90
	6	1,0							1,0	1,89	1,90

p_H 7, wo auch eine Estersynthese nachgewiesen werden kann. Die Disaccharide werden weder bei p_H 6 noch bei p_H 7 zerlegt.

Als das hauptsächlichste Resultat all der mitgeteilten Versuche kann wohl die innige Verknüpfung der Bildung des Phosphorsäureesters mit der „Glykolyse" betrachtet werden. Man wird wohl die Esterbildung als eine notwendige Voraussetzung für den Eintritt der Glykolyse betrachten. Über die chemische Natur dieses Phosphorsäureesters sagt die Untersuchung nichts aus. Die bisherigen Untersuchungen in dieser Richtung sprechen nicht dafür, daß hier eine Glucose- oder überhaupt eine Hexosephosphorsäure vorliegt [1]).

[1]) Vgl. hierzu die Arbeiten von *H. D. Kay*, Biochem. Journ. **18**, 1133, 1924; *J. Greenwald*, Journ. biol. Chem. **68**, 339, 1925; *S. Posternak*, C. r. des séances de la soc. de physique et d'hist. nat. de Génève **43**, 13 und 16, 1926; *H. Jost*, 89. Vers. d. Ges. deutsch. Naturf. u. Ärzte 1926; Physiol. Ber. **38**, 161, 1926. *Anmerkung nach der Korrektur:* Die eben erschienene ausführliche Arbeit von *H. Jost*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **165**, 171, 1927, konnte in dieser Mitteilung nicht mehr berücksichtigt werden.

Zusammenfassung.

1. Der nicht kolloidale, hydrolysierbare Phosphorsäureester des Blutes kommt nur in den Formelementen, nicht im Serum vor; er wird von den Blutkörperchen nicht an die Umgebung abgegeben.

2. Die Zunahme des anorganischen Phosphats während des Stehens des Blutes bzw. der Blutkörperchensuspension infolge fermentativer Hydrolyse ist in bemerkenswerter Weise abhängig von dem Zuckergehalt des Systems: Zuckerzusatz vermindert die Spaltung des Phosphorsäureesters, er verschiebt das Gleichgewicht Phosphorsäureester $\rightleftharpoons$ Phosphorsäure + Alkohol zugunsten der Synthese.

3. Diese Wirkung kommt aber nur der Glucose, der Fructose und der Mannose wie auch in geringem Grade der Galaktose zu; alle die untersuchten Disaccharide, wie auch Milch- und die Brenztraubensäure waren unwirksam.

4. Die Gleichgewichtsverschiebung nach Richtung der Veresterung ist nur im alkalischen Gebiet vorhanden. Von p_H 7,3 an nach der sauren Seite ist für die fermentative Esterspaltung gleichgültig, ob ein Zuckerzusatz statthat oder nicht. Für die Phosphatase liegt ein breites Optimum vor von p_H 6 bis 9.

5. Synthese wie Spaltung sind reversible Vorgänge. Durch Umschaltung einer für die Synthese ungünstigen Reaktion auf eine günstige kann die vorher fehlende Synthese hervorgerufen werden. Dasselbe gilt auch für die Glykolyse.

6. Alle Faktoren, die einer Veresterung ungünstig sind ($p_H < 7{,}3$, Hämolyse, FNa) sind auch für die Glykolyse ungünstig. Zuckerarten, die nicht zur Veresterung führen, werden auch nicht „glykolysiert“. Die Veresterung scheint die Vorbedingung für das Eintreten der Glykolyse zu sein.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Über den Ablauf der postmortalen Autolyse und Proteolyse im Organbrei röntgenbestrahlter Meerschweinchen.

Von

Rudolf Herzger.

(Aus der medizinischen Klinik Leipzig.)

(Eingegangen am 11. März 1927.)

I.

Der Einfluß der Röntgenbestrahlung auf den Ablauf der postmortalen Autolyse bzw. Proteolyse ist bisher nur wenig untersucht worden. *B. Heile* (1) hat in einer Arbeit über die „Autolyse als Heilsfaktor in der Chirurgie" beschrieben, daß die Milz eines mit Röntgenstrahlen vorbehandelten Kaninchens Fibrinflocken in einer Zeit verdaut, in der sie die Milz des Kontrolltieres noch nicht verdaut hat. Ferner haben *Hajós* und *Hofhauser* (2) berichtet, daß die Bestrahlung einen nennenswerten Einfluß auf die eiweißabbauende Funktion der Leberzellen ausübe.

Während *Hajós* und *Hofhauser* die Meerschweinchen einer einmaligen Röntgenbestrahlung aussetzten, habe ich die Tiere nach mehrfacher Bestrahlung untersucht. Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen mittlerer Größe gewählt (Gewicht durchschnittlich 250 bis 400 g). Die meisten Versuche wurden in den Monaten März bis September angestellt, die Fütterung der Tiere soweit als möglich gleichmäßig gehalten. Die Meerschweinchen wurden an sechs hintereinander folgenden Tagen jedesmal eine Viertelstunde bestrahlt. Für die Röntgenbestrahlung wurde ein Radiotransverter (Firma Koch & Sterzel, Dresden) der Leipziger Medizinischen Klinik benutzt. Der primäre Strom hatte eine Stromstärke von 4 bis 5 Ampere, die Spannung betrug 150 Volt. Als Röhren wurden mittelharte Therapieröhren von *Siemens* benutzt. Die Tiere befanden sich frei unter einem Filter in einer Entfernung von 20 cm unter den Röhren. Als Filter wurde erst Zink 0,5, später Aluminium 3 und 5 mm benutzt. Der Röntgenisierungseffekt wurde jedesmal durch Zählung der Leucocyten kontrolliert. Die Leucocytenzahl nimmt nach den ersten Bestrahlungen stark ab. Wenn sie aber erst auf etwa 800 pro 1 cmm zurückgegangen ist, erfolgt das weitere Absinken weniger rasch auf 300 bis 400 pro 1 cmm. Hat die Leucocytenzahl in 1 cmm etwa 250 bis 300 erreicht, und wird mit weiteren Bestrahlungen ausgesetzt, so werden in wenigen Tagen die zuletzt etwas matt gewordenen

Tiere wieder lebhaft, ihr Gewicht nimmt zu, und eine rasche Leucocytose setzt ein. Wird dagegen trotz so niedriger Leucocytenzahl weiter geröntgt, so sterben die Tiere meist ganz plötzlich. Deshalb wurde bei meinen Versuchen die Bestrahlung abgesetzt, wenn die Tiere etwa 300 bis 400 Leucocyten in 1 cmm zeigten. Da *Läwen* (3), der das Verhalten röntgenisierter Tiere gegen bakterielle Infektionen untersuchte, ausführlich auf die Einwände eingeht, die man gegen eine experimentell durch Röntgenstrahlen erzeugte Hypoleucocytose erheben könnte, erübrigt es sich für mich, nochmals darauf zurückzukommen.

Die Tiere wurden nach der letzten Bestrahlung durch Entbluten aus der Carotis getötet. Das Serum der röntgengeschädigten Tiere wurde auf Komplementablenkung und proteolytische Wirksamkeit untersucht, ferner der antitryptische Titer bestimmt. Leber und Lunge wurden entsprechend unten folgender Erläuterung weiterverarbeitet. Es wurde jedesmal die Autolyse und Proteolyse des betreffenden Organbreies durch Bestimmung des Stickstoffes unkoagulierbarer Körper nach der *Kjeldahl*schen Methode untersucht. Leber und Lunge wurden deshalb gewählt, weil histologische Reihenuntersuchungen *Oellers* (4) eine hervorragende Rolle der Zellelemente gerade dieser beiden Organe bei Immunitätsvorgängen nachgewiesen hatten. Von einer Analyse der Milz mußte wegen der Kleinheit des Organs bei Meerschweinchen Abstand genommen werden. Unmittelbar nach dem Entbluten der Tiere wurden Leber und Lunge mit sterilen Instrumenten herausgenommen, in mit Chloroform gesättigter physiologischer NaCl-Lösung etwa anhaftende Blutbestandteile abgespült, Ligamente usw. abpräpariert. Sodann wurden die Organe im Mörser zu einem homogenen Brei zerrieben, der schließlich noch durch ein sterilisiertes Metallsieb getrieben wurde. Nun wurde der Brei in vier gleich große, exakt gewogene Portionen geteilt. Portion a und b zur Bestimmung der Autolyse, Portion c und d zur Bestimmung der Proteolyse. Den Portionen c und d wurden je 10 ccm einer 5proz. Wittepeptonlösung zugesetzt. Um gleiche Volumenverhältnisse zu schaffen, wurden den Portionen a und b je 10 ccm physiologische Kochsalzlösung zugegeben. Jede Portion wurde in ein verschließbares Wägegläschen gefüllt, mit je 1 ccm Chloroform unter- und je 1 ccm Toluol überschichtet. Portion a und c wurden nun im Brutschrank bei 37° 3 Tage der Digestion überlassen. Portion b und d, d. h. eine Portion Leber- bzw. Lungenbrei *ohne* und eine Portion Leber- bzw. Lungenbrei *mit* Zusatz einer Wittepeptonlösung (5proz.) wurden dann sogleich quantitativ in ein Becherglas ausgeschüttet, die Wägeschälchen immer mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung nachgespült und sodann in beiden Bechergläsern im angesetzten Brei durch Zusatz von 10 ccm Tanninlösung die koagulablen N-Verbindungen gefällt. Die Tanninlösung wurde etwas modifiziert nach den Angaben *Hedins* (5) hergestellt, d. h. 50,0 reine Gerbsäure, 25,0 Natriumacetat, 25,0 Kochsalz, 25,0 Eisessig; das Ganze aufgefüllt auf 1 Liter. Nachdem die ausgefällten Breie über Nacht stehengelassen waren, wurde im Filtrat am folgenden Tage der unkoagulierbare „Rest-N“ nach *Kjeldahl* bestimmt. Von den der Digestion überlassenen Portionen a und c wurden vom zweiten Tage ab bakteriologische Abstriche gemacht, um etwaige bakterielle Verunreinigungen auszuschalten. Nach genau dreitägiger Digestion im Brutschrank bei 37° wurden die Portionen a und c ebenfalls quantitativ in Bechergläser umgefüllt und wie oben beschrieben weiter verarbeitet. Die Differenz der jedesmal durch Ammoniak gebundenen Mengen n/10 H_2SO_4 zwischen Portion a (vor der Digestion) und Portion c

(nach der Digestion) — entsprechend b und d — bildet als Reststickstoffzuwachs einen Maßstab zur Beurteilung der stattgehabten Autolyse bzw. Proteolyse. Um eine einwandfrei vergleichbare Beurteilung aller Resultate zu ermöglichen, mußte ich aber davon absehen, lediglich diese Differenz der Stickstoffmengen als Maßstab zu benutzen. Dies ist naturgemäß nur durchführbar unter Verwendung jedesmal gleicher Mengen von Material und unter der Voraussetzung, daß die Stickstoffwerte, die vor Beginn der Digestion gefunden werden, bei allen Tieren nicht in breiten Grenzen schwankende Werte ergeben. Die erste Bedingung habe ich bei fast allen Analysen einhalten können, die zweite. Voraussetzung aber trifft, wie zahlreiche Stickstoffbestimmungen lehrten, nur für das Normaltier zu. Dagegen zeigt der Brei von Organen röntgengeschädigter Tiere erhebliche Schwankungen im Stickstoffgehalt unkoagulabler Körper. Ich habe deshalb im Folgenden zur Beurteilung des autolytischen bzw. proteolytischen Verdauungseffektes das Prozentverhältnis angegeben, das man erhält, wenn man die Differenz, d. h. die Reststickstoffzunahme bei einer Stickstoffbestimmung vor und nach dreitägiger Digestion, in Beziehung setzt zur Menge des im entsprechenden Brei vor der Digestion ermittelten Reststickstoffs. Der so errechnete „prozentuale Zuwachs" beleuchtet meines Erachtens am besten die fermentative Leistung. Ein willkürlich gewähltes Beispiel möge die Berechnung der prozentualen Zunahme darstellen: Ein Brei A zeige vor der Digestion 5 mg N, nach der Digestion 10 mg N; ein Brei B vor der Digestion 7 mg N, nach der Digestion 12 mg N. Der absolute Zuwachs ist in beiden Fällen 5 mg, die prozentuale Zunahme im Fall A 100 Proz., im Falle B dagegen nur 71,4 Proz. Um die Fehlergrenze der N-Bestimmung möglichst niedrig zu gestalten, wurden bei den meisten Hauptversuchen die Leberportionen jeweils zu 3 g, die Lungenportionen zu 1 g gewählt. Da aber die Leber eines mittelgroßen Meerschweinchens höchstens 8 bis 10 g Brei gibt, wurden alle Hauptversuche immer an zwei Parallelticren angestellt, die zu gleicher Zeit unter gleichen Bedingungen bestrahlt wurden. Der Überschuß an Leberbrei wurde zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs benutzt, um das Prozentverhältnis zwischen Gesamt-N und Rest-N unkoagulierbarer Körper ermitteln zu können.

Um Vergleichswerte zu bekommen, wurde erst die *Autolyse und Proteolyse des Organbreies normaler, nicht bestrahlter Meerschweinchen* untersucht.

Ich konnte hier, wie auch bei den Autolyseversuchen an nicht geröntgten sensibilisierten Meerschweinchen, auf die Resultate von *Hashimoto* und *Pick* (6) zurückgreifen. *Hashimoto* und *Pick* geben an, daß die normale Meerschweinchenleber 0,28 Proz. nicht koagulierbaren Stickstoffs enthält, bezogen auf das Gewicht des frischen Organbreies. Die Schwankungen im Prozentgehalt des nicht koagulierbaren Stickstoffs sind verhältnismäßig gering und bewegen sich zwischen 0,19 und 0,31 Proz. Ich fand durchschnittlich eine um ein Minimales geringere Höhe des Prozentgehalts, was wohl in der Verschiedenheit der angewandten Fällungsmethoden (*Pick*, Hitzekoagulation, hier Gerbsäurefällung) begründet liegen mag, wenn es nicht überhaupt in das Bereich der Fehlergrenzen zu rechnen ist.

Tabelle Ia.

Tier vom	Menge des nicht durch Gerbsäure fällbaren N, bezogen auf 10 g frischen Leberbrei g	Prozentgehalt des nicht fällbaren N Proz.
13. III.	0,0243	0,24
17. IV.	0,0329	0,33
30. V.	0,0294	0,29
17. V.	0,0203	0,20

Das heißt durchschnittlich 0,27 Proz. an Stickstoff nicht ausfällbarer Eiweißkörper.

Auch für das Prozentverhältnis zwischen Gesamt-N und Rest-N, auf dessen Bedeutung in der Beurteilung des intravitalen Leberabbaues *Pick* und *Hashimoto* großen Wert legen, bekam ich annähernd dieselben Werte.

Tabelle Ib.

(Für je 1 g Lungenbrei.)

Tier vom	Menge des Rest-N in 1 g Lunge g	Prozentgehalt des Rest-N Proz.	
20. III.	0,0028	0,28	d. h. durchschnittlich 30 Proz.
27. III.	0,00308	0,31	
4. IV.	0,00322	0,32	

Das Verhältnis von Gesamt-N zu Rest-N im Lungenbrei betrug durchschnittlich 10,56 Proz.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Zunahme des nicht ausfällbaren Stickstoffs (hinfort als „Rest-N“ bezeichnet) nach dreitägiger Digestion im Brutschrank bestimmt. Beim Leberbrei zeigte es sich, daß die prozentuale Zunahme an Rest-N nach einer Digestion von 72 Stunden bei der autolytischen und der proteolytischen Spaltung nahezu gleich ist. Für die normale Leber fand sich bei der Autolyse wie bei der Proteolyse eine prozentuale Zunahme von etwa 96,6 Proz. Die Schwankungen dieser prozentualen Zunahme bewegten sich bei den in angegebener Weise verarbeiteten Leberbreien in engen Grenzen. Für den Lungenbrei dagegen konnte ich nicht so gleichmäßige Werte feststellen. Mehrfach angestellte Kontrollversuche haben mich davon überzeugt, daß es sich dabei kaum um vermeidbare Fehler der Versuchstechnik handeln kann. Immerhin wäre wohl möglich, daß bei der Schwierigkeit, das viel zähere Lungengewebe zu einem homogenen Brei zu zerreiben, etwaige nicht völlig zerriebene Gewebsteilchen die autolytische bzw. proteolytische Spaltung hemmend beeinflussen.

Im folgenden seien die im normalen Brei gefundenen Werte eines Falles als Beispiel wiedergegeben:

Tabelle I c.

		Vor Beginn der Digestion	Nach Schluß der Digestion	Prozentuale Zunahme des Rest-N bei der autolyt. bzw. proteolyt. Spaltung Proz.
Leber	3 g Brei Autolyse	5,2 ccm n/10 H_2SO_4	10,2 ccm n/10 H_2SO_4	96,7
	3 g Brei Proteolyse (Pepton)	17,8 „ „ „	35,0 „ „ „	96,6
Lunge	1 g Brei Autolyse	2,0 „ „ „	2,7 „ „ „	35
	1 g Brei Proteolyse (Pepton)	15,9 „ „ „	21,2 „ „ „	33,3

Autolyse und Proteolyse bei röntgengeschädigten Meerschweinchen.

Die Organbreie von in oben angegebener Weise mehrfach röntgenbestrahlten Meerschweinchen zeigen nach dreitägiger Digestion im Brutschrank eine hohe prozentuale Zunahme an unkoagulierbarem Stickstoff. Gleichzeitig sind im allgemeinen die vor Beginn der Digestion ermittelten Stickstoffmengen geringer als die normaler Tiere. Es fanden sich z. B.:

Tabelle II a.

		Rest-N bezogen auf 10 g Leberbrei g	Rest-N in 1 g Lungenbrei g
Normaltiere		0,0243	
		0,0329	0,0028
		0,0294	0,00308
		0,0203	0,00322
Geröntgte Meerschweinchen	221/22	0,0168	0,00154
	223/24	0,0173	0,0009
	240	0,0196	0,0023

Es findet sich bei den röntgengeschädigten Tieren eine prozentuale Zunahme an Rest-N bei der Autolyse des Leberbreies nach 3 Tagen, die um 50 bis 60 Proz. höher ist als die entsprechende Zunahme der postmortalen Autolyse normaler Meerschweinchenorgane. Bei der Proteolyse findet sich eine deutliche, allerdings etwas geringere Steigerung. In gleicher Weise läßt sich auch im Lungenbrei röntgengeschädigter Meerschweinchen eine Erhöhung der prozentualen Zunahme der postmortalen autolytischen und proteolytischen Spaltung nachweisen.

Als Beispiel mögen die bei Meerschweinchen 221 und 222 gefundenen Zahlen angegeben werden:

Meerschweinchen 221: Gewicht 280 g. Bestrahlt je eine Viertelstunde am 13., 14., 15., 16., 17., 19., 20. März. Leucocytenzahl am 16. März: 2800, am 19. März: 400. Getötet durch Entbluten am 21. März.

Meerschweinchen 222: Gewicht 200 g. Bestrahlt gleichzeitig mit Meerschweinchen 221. Leucocyten am 16. März: 2600, am 20. März: 400.

Tabelle IIb.

Meerschweinchen 221/22		Vor Beginn der Digestion	Nach Schluß der Digestion	Prozentuale Zunahme an Rest-N Proz.
Leber	3 g Brei Autolyse	3,6 ccm n/10 H_2SO_4	8,9 ccm n/10 H_2SO_4	147,2
	3 g Brei Proteolyse	15,3 „ „ „	37,2 „ „ „	143,1
Lunge	1 g Brei Autolyse	—	—	—
	1 g Brei Proteolyse	13,5 „ „ „	21,3 „ „ „	57,2

Während bei der Autolyse und Proteolyse des normalen Organbreies sich annähernd gleiche Werte ergaben, zeigten die Breie geröntgter Tiere immerhin beträchtliche Differenzen. Es ist dies vielleicht damit zu erklären, daß sich infolge des bei röntgenbestrahlten Tieren gesteigerten postmortalen autolytischen Zerfalls Reaktionsprodukte so anhäufen, daß die fermentative Zersetzung bei der Größe der aufeinander wirkenden Eiweißmassen (Organbrei + zugesetzte 5proz. Wittepeptonlösung) den Reaktionsablauf schließlich hemmend beeinflußt wird. Die Beobachtung der gesteigerten postmortalen Autolyse im Organbrei röntgengeschädigter Meerschweinchen stimmt mit den veröffentlichten Befunden von *Hajós* und *Hofhauser* (l. c.) überein.

Die Wirkung einer einmaligen Bestrahlung auf den Leberbrei normaler Meerschweinchen.

Um eine Wirkung der Röntgenbestrahlung in vitro zu untersuchen, wurde Leberbrei normaler Meerschweinchen in oben angegebener Weise verarbeitet, zwei der Portionen eine Viertelstunde lang ohne Filter im geschlossenen Wägeschälchen bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde je ein geröntgter und ein nicht geröntgter Leberbrei desselben normalen Meerschweinchens 72 Stunden im Brutschrank der Digestion überlassen, in zwei anderen Portionen nach Tanninfällung der Stickstoff bestimmt. Bei einer Anzahl ausgeführter Analysen konnte kein direkter Einfluß der Röntgenbestrahlung in vitro festgestellt werden. Teils wurden Werte gefunden, die bis auf eine Dezimalstelle den Werten normaler Breie gleich waren, teils sogar Werte, die etwas unter der Norm lagen.

Nach den bisher veröffentlichten Arbeiten fanden *Hajós* und *Hofhauser* in vitro keinen nennenswerten Einfluß der Röntgenbestrahlung. *Meyer* und *Behring* (8) fanden im Leberbrei, der 5 Tage hindurch intensiv bestrahlt wurde, nur eine geringe Beschleunigung der postmortalen Autolyse. Über den Einfluß der Röntgenstrahlen auf die verschiedenen Fermente vgl. *Oppenheimer* (9).

Das Serum röntgengeschädigter Meerschweinchen.

Die Wirkung der Röntgenbestrahlung auf den Gehalt an spezifischen Immunkörpern hat bereits eine ausgedehnte Bearbeitung gefunden. Ich habe mich darauf beschränkt, nur einige für die Deutung meiner eigenen Versuche notwendige Untersuchungen anzustellen.

Läwen (l. c.) fand, daß nach ausgedehnter Bestrahlung von Tieren und damit verbundener Zerstörung einer beträchtlichen Anzahl von Leucocyten die bakterizide Kraft des Serums nicht verändert wurde. Im Gegensatz hierzu fand *Läwen* eine Hemmung der spezifischen, auf die Infektion hin gebildeten Agglutine und wahrscheinlich auch der spezifischen Bakteriolysine. *Quadrone* (10) will eine Steigerung der hämolytischen Kraft und der Resistenz gegenüber Typhus, Diphtherie und Tetanus beobachtet haben. *Benjamin* und *Sluka* (11) berichten von einer Herabsetzung der Präzipitinbildung bei den mit Röntgenstrahlen vorbehandelten Kaninchen. Im Gegensatz hierzu fand *Leidenfrost* (12) keinen Einfluß auf die im Blute bereits vorhandenen Präzipitine. Eine Verzögerung der Bildung der sogenannten *Abderhalden*schen Abwehrfermente bei der Strahlenbehandlung veröffentlichten *Keitler* und *Lindner* (13). *Manoukhine* (14) will durch Milzbestrahlung einen viel höheren Typhus- und Cholera-Agglutinintiter und Hammelbluthämolysintiter erhalten haben als bei Kontrolltieren. *Fiorini* und *Zironi* (15) berichten, daß Röntgenbestrahlung

1. keinen Einfluß auf die Produktion von Agglutininen habe, desgleichen auf Substanzen, die die Komplementablenkung bewirken, und auf Hämolysine;
2. keinen Einfluß auf den Gehalt des Serums an Immunkörpern habe.

Kaznelson und *Lorant* (16) berichten über nachgewiesene geringe Beeinflussung der Agglutinationsbestimmung. Keinen Einfluß auf Agglutinine fanden *Schulze* (17), *Fränkel* und *Schilling* (18). Außerdem stellte *Fränkel* (19) fest, daß das Komplement nicht abhängig ist von der Leucocytenzahl. Auch *Heinrich* (20) fand keinen Einfluß der Röntgenbestrahlung auf die quantitativen Verhältnisse des Komplements. *Andersen* und *Emerich* (43) fanden keine Abschwächung des in vitro bestrahlten Komplements.

Andere Wirkungen der Röntgenstrahlen auf das Serum sind von amerikanischen Forschern untersucht worden. So fand *Raymond G. Hussey* (21) eine Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration im Sinne einer Alkaleszenz, die ihr Minimum zwischen 3 bis 5 Stunden nach der Bestrahlung erreicht.

F. Petersen und *C. C. Saelhof* (22) haben einen gesteigerten Titer der Serumenzyme nach Bestrahlung der Leber gefunden. Die Stickstoffausscheidung war bei ihrem Versuchen um 60 Proz. gestiegen und noch 4 Tage auf dieser Höhe geblieben. Der nichtkoagulable Stickstoff nahm nach Reizbestrahlung der Leber für mehrere Tage um 50 Proz. zu. Desgleichen fanden die Autoren den proteolytischen Titer des Serums nach Leberbestrahlung angestiegen. Beeinflussung der p_H-Konzentration, des

Blutzuckers, Cholesterins und Eiweißgehalts im Serum nach Röntgenbestrahlung sind berichtet von *Anderson* und *Kohlmann* (44), sowie *Knipping* und *Kowitz* (45).

Ich selbst habe am Serum der in oben angegebener Weise bestrahlten Tiere untersucht:

1. die Präzipitation gegen inaktiviertes Menschenserum und habe diese negativ gefunden;
2. habe ich den Komplementablenkungsversuch angestellt:
   a) gegen Hammelblut in Verdünnung 1 : 40 und
   b) gegen Hammelblut + Ambozeptor.

Bei a) trat keine Hämolyse ein, bei b) eine unbedeutende Hemmung der Hämolyse;

3. die Proteasewirkung.

Zur Prüfung des Serums auf Proteasen bediente ich mich der von *Schierge* (23) angegebenen Methode, d. h. es werden in zehn sterilisierte Reagenzgläser je 1 ccm physiologische NaCl-Lösung gefüllt, dazu je 1 ccm einer 5proz. Wittepeptonlösung. Gleichzeitig wird von dem zu untersuchenden Serum eine Verdünnungsreihe hergestellt, etwa Originalserum, Verdünnung 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 120 usw. bis 1 : 2560. Von jeder Verdünnungsstufe wird 1 ccm in die entsprechenden Reagenzgläser überpipettiert. Sodann werden die Röhrchen mit Toluol überschichtet und für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden wird durch Zusatz von 0,2 ccm einer 5proz. Essigsäurelösung und Bromwasser die Tryptophanprobe angestellt. Je nach der Menge des abgebauten Tryptophans tritt eine schmutzigrote, rote oder rosa Verfärbung auf. Die Grade der Reaktion werden in der üblichen Weise in ++++, +++, ++, +, ±, — wiedergegeben. Ich fand für das Serum normaler Meerschweinchen: ++++, ++, +, +, ±, ±, —, —, —, —, —, für das Serum röntgengeschädigter Tiere: ++++, ++, ++, +, +, ±, ±, —, —, —, d. h. eine geringe Erhöhung der proteolytischen Wirkung des Serums röntgengeschädigter Meerschweinchen. Die Proteasen scheinen jedoch nicht sehr widerstandsfähig zu sein, da die gleiche Probe an demselben Serum nach eintägigem Verweilen im Eisschrank bereits in einer Verdünnung von 1 : 40 Wittepepton nicht mehr bis zum Tryptophan abbaute. Bei den Kontrollversuchen konnten die Angaben *H. Pfeifers* über das hohe Spaltungsvermögen des Meerschweinchenserums bestätigt werden.

Die Beeinflussung der postmortalen Autolyse durch Zusatz von Serum röntgengeschädigter Tiere zu Organbreien normaler, unvorbehandelter Tiere.

Um festzustellen, ob sich die nachgewiesene Steigerung der postmortalen Autolyse und Proteolyse der Organe röntgengeschädigter Meerschweinchen durch Zusatz von Serum eines derart vorbehandelten



Tieres auch auf den Organbrei normaler Meerschweinchen passiv übertragen lasse, wurde folgender Versuch angesetzt:

Ein Meerschweinchen wurde in angegebener Weise bestrahlt, durch Entbluten getötet und je 0,5 ccm des Serums dem Organbrei normaler Meerschweinchen zugesetzt. Aus äußeren Gründen mußte ich bei dieser Versuchsreihe alle Breie 6 Tage lang digerieren lassen, so daß sich die gefundenen Zahlen nicht mit den übrigen in dieser Arbeit angegebenen, sondern nur untereinander vergleichen lassen. Es fand sich in diesen Organbreien eine Hemmung der Autolyse und der Proteolyse, wie sie nach den Untersuchungen von *Baer* und *Loeb* (24), *Hedin* und *Rowland* (25) zu erwarten war.

Zusammenfassung.

1. Leber und Lunge röntgenbestrahlter Meerschweinchen zeigen eine deutlich gesteigerte postmortale Autolyse und Proteolyse (die Steigerung beträgt bei 72stündiger Digestion 50 bis 60 Proz.).
2. In vitro läßt sich eine wesentliche Beeinflussung der postmortalen Autolyse bzw. Proteolyse durch Röntgenbestrahlung nicht feststellen.
3. Das Serum röntgenbestrahlter Meerschweinchen zeigt keine Präzipitation gegenüber inaktiviertem Menschenserum.
4. Trotz außerordentlich herabgesetzter Leucocytenzahl zeigt solches Serum im Verhalten der Komplementablenkung keine Abweichung gegenüber normalem Meerschweinchenserum, d. h. also, die Komplementbildung ist offenbar unabhängig von der Zahl der Leucocyten.
5. Das Serum röntgengeschädigter Meerschweinchen zeigt eine schwache, aber deutliche Steigerung seines proteolytischen Vermögens.

II.

Angeregt durch histologische Befunde *Oellers* (l. c.) an Meerschweinchen, denen nach mehrfacher Röntgenbestrahlung apathogene Bakterien injiziert wurden, wurden eine Anzahl Untersuchungen ausgeführt an Meerschweinchen, die unmittelbar nach Einverleibung eines Antigens, und an solchen, die längere Zeit danach getötet wurden. Die Vorbehandlung der Tiere war die gleiche wie bei den ersten Versuchen. Nach Reduktion der Leucocyten auf 300 bis 400 pro 1 cmm wurden den Tieren je zehn Ösen einer Tetragenuskultur, in $\frac{1}{2}$ ccm physiologischer Kochsalzlösung verrieben, in die freipräparierte Vena jugularis injiziert und die Tiere in einer ersten Versuchsreihe 15 Minuten, in einer zweiten 60 Minuten nach der Injektion durch Entbluten aus der Carotis getötet und Leber und Lunge in oben angegebener Weise weiter verarbeitet.

Bei solchen Tieren zeigt sich nach der Injektion eine stetig zunehmende Lungenblähung, die ihren Höhepunkt etwa ½ bis 1 Stunde nach der Injektion erreicht. Mitunter werden bei solchen Tieren schockartige Symptome ausgelöst: Die Tiere taumeln, fallen um und sterben teilweise in Atemkrämpfen, oft aber erfolgt nach einigen schnappenden Atemzügen wieder Erholung. Erscheinungen, die unvorbehandelte Meerschweinchen nach Injektion des gleichen Antigens vermissen lassen.

Bei den Tieren der ersten Versuchsreihe, d. h. getötet 15 Minuten nach der Injektion, ergab sich folgendes interessante Bild: Der Gehalt der Leber und Lunge an Stickstoff nicht ausfällbarer Körper ist erhöht und übertrifft merklich den Rest-N-Gehalt normaler Meerschweinchenorgane. Während der Normalgehalt an Rest-N, wie oben erwähnt, in engen Grenzen schwankend, durchschnittlich etwa 0,27 Proz. pro 10 g frischen Leberbreies beträgt, fand ich bei dieser Versuchsreihe Rest-N-Werte von durchschnittlich 0,36 Proz. Als Prozentverhältnis zwischen Gesamtstickstoff und Reststickstoff erhielt ich in einem Falle 7,3 Proz., in einem anderen 11,86 Proz. bei einem Gesamt-N von 0,318 g in dem einen und 0,343 g in dem anderen Falle, bezogen auf 10 g Leberbrei (nach *Pick*, l. c., durchschnittlich 0,318 g), d. h. in einem Falle ein nahezu dem Durchschnittsverhältnis des normalen Meerschweinchens entsprechendes Prozentverhältnis, im anderen eine bedeutende Steigerung über die von anderen als Norm veröffentlichten Werte und damit ein Prozentverhältnis, das nach den Arbeiten von *Pick* und *Hashimoto* (l. c.) ungefähr der Leber eines wiederholt mit Pferdeserum vorbehandelten Meerschweinchens entspricht, d. h. genau wie bei den mit Eiweiß wiederholt vorbehandelten Tieren eine deutliche Hemmung der sonst nach einmaliger Einweißinjektion (Sensibilisierung) gesteigerten intravitalen Leberautolyse (*Pick*) eintritt, zeigt sich ein analoges Verhalten bei Meerschweinchen, die, durch wiederholte Röntgenbestrahlung vorbehandelt, mit Antigen — in unserem Falle artfremdem Eiweiß — nicht mehr zu einer von *Hashimoto* und *Pick* nach einmaliger Injektion von artfremdem Eiweiß beobachteten intravitalen Leberautolyse gebracht werden können. Während der Gehalt der Organbreie an Stickstoff nicht ausfällbarer Körper und noch mehr als dieser das Prozentverhältnis zwischen Gesamt-N und Rest-N der röntgenbestrahlten und 15 Minuten nach der Bakterieninjektion getöteten Meerschweinchen wieder eine gewisse Annäherung an die entsprechenden, bei normalen Meerschweinchen gefundenen Werte ergibt, zeigt die Betrachtung der prozentualen Zunahme der Breie an nichtkoagulierbarem Stickstoff bei der postmortalen Autolyse und Proteolyse ein wesentlich anderes Verhalten als bei normalen Tieren: im Brei solcher Tiere erleidet die postmortale Autolyse eine aus-

gesprochene Hemmung, die Proteolyse ist ebenfalls, allerdings geringer als die Autolyse, gehemmt. Die postmortale Proteolyse des Lungenbreies dagegen ist deutlich gesteigert. Die Werte zeigten größere Schwankungsbreite als in den eingangs berichteten Versuchen, was wohl in der Verschiedenheit der Gesamt- und der Organdisposition der Tiere bakteriellen Infekten gegenüber seine Erklärung findet. Bevor über die zu dieser Versuchsreihe gehörigen serologischen Befunde berichtet wird, sollen erst die Resultate im *Ablauf der postmortalen Autolyse und Proteolyse im Organbrei röntgengeschädigter Meerschweinchen, die 60 Minuten nach Injektion des „Antigens" getötet wurden*, wiedergegeben werden.

Aus dem Prozentverhältnis zwischen Gesamt-N und Rest-N ergab sich bei dieser Versuchsreihe, daß der Ablauf der intravitalen Leberautolyse nicht mehr gestört ist bzw. ein gewisses Gleichgewicht wiedererlangt hat. Dagegen ist die postmortale Autolyse und Proteolyse der Leber und Lunge bei den Meerschweinchen, die 60 Minuten nach Injektion der Bakterienaufschwemmung getötet wurden, noch immer deutlich gehemmt. Aus den Kontrollversuchen ergab sich jedesmal eine deutliche Hemmung der postmortalen Autolyse und Proteolyse des Leberbreies, eine geringe Hemmung der Autolyse des Lungenbreies und eine mäßig gesteigerte Proteolyse des Lungenbreies.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Röntgengeschädigte Meerschweinchen zeigen unmittelbar nach parenteraler Zufuhr artfremden Eiweißes einen etwas über die Norm gesteigerten intravitalen Eiweißabbau der Leber. Die postmortale Autolyse des Leberbreies ist außerordentlich gehemmt, sistiert fast. Etwas schwächer, aber noch immer deutlich gehemmt ist die postmortale Autolyse des Lungenbreies. In gleichem Maße wie die postmortale Lungenautolyse ist die postmortale Leberautolyse gehemmt. Dagegen ist die postmortale Lungenproteolyse mäßig gesteigert.

Nach einer Stunde bereits hat bei solchen Meerschweinchen der *intravitale* Eiweißabbau, der in dem Prozentverhältnis zwischen Gesamt-N und Rest-N seinen Ausdruck findet, wieder normalen Umfang angenommen. Im Gegensatz hierzu ist die postmortale Leberautolyse zwar wieder in Gang gekommen, zeigt aber noch immer langsamen Verlauf. Ähnlich die postmortale Autolyse der Lunge, deren Ablauf sich schon ihrem normalen Verlauf nähert, während die postmortale Proteolyse des Lungenbreies noch immer gesteigert ist. Wenn es zulässig ist, aus dem Verlauf der postmortalen fermentativen Vorgänge Rückschlüsse auf das Geschehen im lebenden Organismus zu ziehen, so stimmen diese Befunde gut mit denen überein, die *Oeller* (l. c.) für den Ablauf zellreaktiver Vorgänge im histologischen Bilde nachweisen konnte. Dem Vermögen der Lungenendothelien, das parenteral zu-

geführte Fremdmaterial schon nach wenigen Minuten zur Haftung zu bringen bei Tieren, bei denen die fortgesetzte Röntgenbestrahlung noch nicht die zellreaktiven Vorgänge in ihrem Ablauf geschädigt hat, steht eine deutliche Steigerung der postmortal nachweisbaren proteolytischen Fähigkeit des Lungenbreies zur Seite. Der gesteigerte intravitale Eiweißabbau in der Leber hat vielleicht eine plötzlich einsetzende „Bindung" der autolytischen und postmortal proteolytisch wirksamen Fermente im Gefolge. Daß die parenterale Zufuhr von körperfremdem Eiweiß aber eine Beanspruchung des gesamten proteolytisch wirksamen Fermentsystems darstellt, zeigt die Hemmung der postmortalen Autolyse nicht nur in der Leber, sondern auch in der Lunge.

Bei diesen Versuchsreihen wurde immer auch das Serum in gleicher Weise wie bei den eingangs beschriebenen Versuchsreihen untersucht.

Beim Hämolyseversuch fand sich durchweg sowohl 15 wie 60 Minuten nach der Bakterieninjektion gegen Hammelblut keine, und gegen Hammelblut und Ambozeptor völlige Hämolyse.

Hinsichtlich der Proteasewirkung im Serum dieser Tiere ergab sich folgendes Bild:

Ausfall der Tryptophanprobe nach 24stündiger Digestion im Brutschrank bei röntgengeschädigten Tieren: ++++, ++, ++, +, +, ±, ±, —, —, —.

Bei Seren röntgengeschädigter Meerschweinchen, die 15 Minuten nach parenteraler Zufuhr von artfremdem Eiweiß (Tetragenusaufschwemmung) getötet wurden: ++, ++, +, +, ±, —, —, —, —, —.

Die Tryptophanprobe im Serum röntgengeschädigter Meerschweinchen, die 60 Minuten nach parenteraler Zufuhr von artfremdem Eiweiß getötet wurden, ergab folgenden Ausfall: +++, ++, +, +, ±, ±, —, —, —, —, d. h. das Serum von unmittelbar nach der Antigeninjektion getöteten Tieren entfaltet nur noch bis zu einer Verdünnung von 1 : 40 eine deutliche proteolytische Wirkung, die in Verdünnung 1 : 80 kaum noch erkennbar ist. Bei den nach 60 Minuten getöteten Tieren ist der Eiweißabbau bis zum Tryptophan noch nachweisbar bis zu einer Verdünnung von 1 : 160. Aus diesen Resultaten ist ersichtlich, daß die Unterschiede der proteolytischen Kraft des Serums zwischen den einfach röntgengeschädigten Tieren und den Tieren dieser Versuchsreihen nicht sehr groß sind. Es scheint aber doch mit der ausgesprochenen Hemmung der postmortalen Autolyse der Organe röntgengeschädigter, kurz nach parenteraler Einverleibung der Bakterienaufschwemmung getöteter Tiere gleichzeitig ein geringes Absinken der Serumproteasewirkung parallel zu gehen und, wenn nach 60 Minuten die postmortale Autolyse nur noch geringe Hemmung aufweist, auch die Serumproteasen wieder eine der Norm genäherte Wirksamkeit zu entfalten.

In den Seren dieser Tiere wurde gleichzeitig noch der antitryptische Titer bestimmt. Ich habe mich dazu einer von *Schierge* (l. c.) modifizierten Ausführung bedient, die von der *Fuld-Gross*schen Methode und der von *v. Bergmann* und *Meyer* (26) angegebenen Technik etwas abweicht.

Es werden zur Bestimmung des Titers benötigt:
A. 1 prom. Sodalösung,
B. 1 prom. Trypsinlösung in 1 prom. Sodalösung,
C. 1 prom. Caseinlösung in 1 prom. Sodalösung.
Zuerst erfolgt die Austitrierung des Trypsins.
Fünf Röhrchen werden folgendermaßen gefüllt:

1	2	3	4	5	
0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	Trypsinlösung
1,2	1,4	1,6	1,8	1,9	Sodalösung
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	physiol. Kochsalzlösung
1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	Caseinlösung
—	—	—	—	+	15 Min. im Wasserbad bei 37,0° C

Nach 15 Minuten fällt man mit Alkohol-Essigsäurelösung (50,0 Alkohol + 50,0 Aqua dest. + 0,5 Eisessig). Dasjenige Röhrchen (im angegebenen Beispiel 4), in welchem gerade eben noch keine Flockung auftritt, ist das Teströhrchen. Vom Serum wird jetzt eine Verdünnungsreihe derart hergestellt: $^1/_{50}$, $^1/_{100}$, $^1/_{200}$, $^1/_{400}$ bis $^1/_{6400}$.

Eine Reihe Röhrchen werden nun mit der im Vorversuch ermittelten Testlösung beschickt und dann, mit schwächster Konzentration beginnend, das verdünnte Serum zugesetzt. Wiederum 15 Minuten Wasserbad und Alkoholfällung. Zeigen jetzt eine Reihe Röhrchen Flockung, so deutet dies auf Hemmung der tryptischen Wirkung. Zwei Röhrchen, Nr. 9 und 10, werden statt mit Serum mit physiologischer Kochsalzlösung beschickt und dienen zur Kontrolle, daß nach 12 Minuten noch keine, aber nach 15 Minuten schwache Fällung eintritt.

Unter Benutzung der angeführten Methode zeigte sich, daß die antitryptische Wirkung des Serums röntgengeschädigter Meerschweinchen bedeutend erhöht ist gegenüber normalem Meerschweinchenserum. Während normales Meerschweinchenserum nur etwa bis zu einer Verdünnung von 1 : 100 bei einer Testlösung von 0,2 Trypsin den Abbau der 1 prom. Caseinlösung hemmt (schwache Trübung, keine eigentliche Flockung), erstreckte sich die antitryptische Wirkung des Serums röntgengeschädigter Meerschweinchen bis zu einer Serumverdünnung von 1 : 3200.

Da nun durch die Untersuchungen *Rosenthals* (27) erwiesen scheint, daß die antitryptische Wirkung normaler und pathologischer Seren bedingt ist durch ihren natürlichen Gehalt an Eiweißkörpern, so stimmt der Ausfall meiner Versuche mit der zu erwartenden Wirkung überein. Wie aus dem Vorangegangenen ersichtlich, hat die wiederholte Röntgenbestrahlung einen gesteigerten Eiweißabbau in den Organen

zur Folge. Im Serum angehäufte Spaltprodukte hemmen aber nach *Bayliss* (28) die Wirkung des entsprechenden Ferments wegen der Reversibilität der Enzymreaktion und wegen Adsorption des Ferments an die Abbauprodukte. Führt man nun solchen röntgenbestrahlten Meerschweinchen parenteral Tetragenus zu und tötet die Tiere nach 15 Minuten, so zeigt sich eine stark antitryptische Wirkung bis zu einer Serumverdünnung 1 : 6400, bei einer Testlösung von 0,1 Casein.

Entsprechend vorbehandelte Tiere, nach 60 Minuten getötet, entfalten im Serum stark antitryptische Wirkung bis zu einer Verdünnung von 1 : 100, die aber bei gleicher Testlösung nur bis zu einer Verdünnung von 1 : 800 deutlich ist. Es ergibt sich demnach, daß bei röntgengeschädigten Meerschweinchen, denen Tetragenus intravenös injiziert worden ist, 15 Minuten nach der Injektion der antitryptische Titer sehr stark erhöht ist, während sich nach 60 Minuten eine deutliche Hemmung der antitryptischen Wirksamkeit zeigt. Der Ausfall dieser Versuche erinnert an das Verhalten des antitryptischen Titers im Serum von anaphylaktischen Meerschweinchen.

(Eine wesentliche Erhöhung des antitryptischen Titers im Serum des anaphylaktischen Tieres ist von *Rusznyak* (29) nachgewiesen.) *Pfeiffer* und *Jarisch* (30) fanden die gleiche Erscheinung bei Vergiftung mit natürlichem Rinderhämolysin. Außerdem konnten *Pfeiffer* und *de Crinis* (31) feststellen, daß in der ersten Periode des anaphylaktischen Schocks von mit Eiereiweiß vorbehandelten und nachgespritzten Meerschweinchen das hemmende Vermögen des Serums dieser Tiere das normaler Tiere übertrifft. Danach folgt ein Absinken des Gehalts der Seren an Eiweißspaltprodukten und parallel damit ein Absinken des Hemmungsvermögens. Schließlich folgt wiederum ein tertiärer Titeranstieg, der zeitlich mit dem Erholen der Tiere zusammenfällt. Dementsprechend würden die Seren meiner nach 15 Minuten getöteten Tiere in die erste Periode des gesteigerten antitryptischen Titers, die Seren der nach 60 Minuten getöteten Tiere bereits in die zweite Periode, die mit einer Hemmung der antitryptischen Wirkung einhergeht, fallen.

Aus dem Verhalten des antitryptischen Titers im Serum meiner Tiere, sowie aus allen vorhergehenden Versuchen geht hervor, daß sich mehrfach röntgenbestrahlte Meerschweinchen in vieler Hinsicht ähnlich verhalten wie sensibilisierte bzw. immunisierte Tiere. Jede aufeinander folgende Röntgenbestrahlung hat eine Beeinflussung des intrazellulären Stoffwechsels im Sinne eines gesteigerten Eiweißabbaues, der sich schon in der hochgradigen Zerstörung der Leucocyten zeigt, zur Folge. Der Nachweis der Röntgenstrahlenwirkung auf das körperliche Eiweiß ist durch zahlreiche Untersuchungen erbracht worden.

Klopstock berichtet von einer Abnahme des Albumins und Zunahme der Globuline (32). *Neuberg* und *Schwarz* (33) führen die biochemischen Lichtwirkungen auf physikalische Veränderungen des Eiweißes unter dem Einfluß von Photokatalysatoren (Metallsalze als Sensibilisatoren) unter

Mitbeteiligung von Sauerstoff zurück. Diese von *Neuberg* nachgewiesene Photooxydation des Eiweißes hat *Gaffron* (34) unter *Warburgs* Leitung bestätigt. *Falta* (35) gibt als derartige Sensibilisatoren Galle, Cholin usw. an. *Schinz* (36) hat gefunden, daß nach Bestrahlung der Viskositätswert des Serums sinkt infolge Dispersitätsveränderung der Eiweißkörper, daß nach Bestrahlung eine absolute und relative Abnahme der Albumine, eine absolute und relative Zunahme der Globuline nachweisbar ist. Nach *Müller* (37) ist es möglich, Zellzerfallsprodukte durch den *Läwen-Trendelenburg*schen Froschversuch am Blutserum und Plasma bei Versuchstieren und Menschen nach großen Bestrahlungen nachzuweisen. Diese Zerfallsprodukte treten bald nach der Bestrahlung auf und erreichen ihr Maximum nach 36 Stunden und verschwinden am dritten oder vierten Tage wieder.

Wie nun die Wirkung auch zustande kommen mag, Zellzerfallsprodukte und Eiweißspaltungen nach Röntgenbestrahlungen sind von mehreren Seiten nachgewiesen worden. Ich glaube nun, durch meine Versuche den Nachweis erbracht zu haben, daß mehrfach röntgenbestrahlte Meerschweinchen in ihrem biologischen Verhalten, nachgewiesen am Ablauf der postmortalen Autolyse und Proteolyse des Leber- und Lungenbreies, an den Schwankungen der Serumproteasewirkung und des antitryptischen Titers sich so verhalten wie Tiere, die durch parenterale Zufuhr körperfremden Eiweißes sensibilisiert wurden, so daß bei nachträglicher Einverleibung einer Bakterienaufschwemmung makroskopisch und biologisch anaphylaktoide Reaktionen auftreten. Offenbar treten beim intravitalen Eiweißabbau nach Röntgenbestrahlung im Körper der Tiere Spaltprodukte auf, die in ihrer Wirksamkeit eine gewisse Labilität des Organismus zur Folge haben, so daß die intravenöse Bakterieninjektion einen Reiz darstellt, der die sofortige Auslösung von Symptomen einer Peptonvergiftung bzw. eines leichten, aspezifisch anaphylaktischen Schocks [*Brack* (38)] hervorruft. Hiermit läßt sich gut vereinbaren, daß im histologischen Bilde schwach röntgengeschädigte Meerschweinchen ein etwas gesteigertes zelluläres Bindungsvermögen für Bakterien, Hühnerblutkörperchen usw. zeigen. Findet doch durch die wiederholte Bestrahlung eine wiederholte Umwandlung von Albuminen und Globulinen statt, die ihrerseits nach den Untersuchungen von *Hamburger*, *Höber* usw. die Adsorption und dadurch die Phagocytose erhöhen. Auf Grund der angegebenen Resultate habe ich noch einige Orientierungsversuche angestellt, ob sich etwa eine echte Röntgen-Röntgenanaphylaxie mit dem typischen Symptomenkomplex eines anaphylaktischen Schocks auslösen ließe, ohne daß überhaupt Eiweiß von außerhalb des Körpers eingeführt würde. Ich hatte zu diesem Zwecke Meerschweinchen an drei aufeinander folgenden Tagen durch Röntgenbestrahlung sensibilisiert (Leucocyten 500). Sodann 14 Tage nach der letzten Bestrahlung — die Leucocyten waren wieder auf 1000 pro 1 cmm gestiegen — noch einmal bestrahlt und die Tiere unmittelbar danach getötet. Außer-

lich zeigten die Tiere in keiner Weise das typische Bild eines Schocks. Es ergab sich als Prozentverhältnis zwischen Gesamt-N und Rest-N der Wert von etwa 10,2 Proz. Ein Wert, der nach dem Vorausgegangenen auf eine um ein Geringes gesteigerte intravitale Leberautolyse deutet und nicht dem entspricht, was man in einem typischen anaphylaktischen Schock erwarten mußte [*Pick* und *Hashimoto* (39)]. Ebenso erhielt ich hinsichtlich der postmortalen Leber- und Lungenautolyse in mehreren Versuchen keine übereinstimmenden Ergebnisse, da ich im entsprechenden Brei teils eine Hemmung, teils eine Steigerung der postmortalen Autolyse fand. Dieses negative Resultat läßt sich wohl damit erklären, daß die 14 Tage nach der Sensibilisierung durch Röntgenbestrahlung vorgenommene einmalige Bestrahlung einen viel zu geringen Reiz darstellt, als daß dieser zur Auslösung anaphylaktischer Reaktionen führen könnte. Tritt doch auch das typische Bild der Anaphylaxie dann besonders hervor, wenn zur Auslösung des Schocks große Dosen des Antigens in den Kreislauf des mit kleinen Dosen sensibilisierten Tieres eingeführt werden.

Zusammenfassend glaube ich, aus den von mir angestellten Versuchen schließen zu können, daß die nach mehrfach wiederholter Röntgenbestrahlung auftretenden Fermentreaktionen nicht die Folge der direkten Strahlenwirkung im Sinne eines leistungssteigernden, stimulierenden Reizes ist, sondern die Folge einer Proteinwirkung, die auf dem indirekten Wege über Zellverfall durch die auftretenden Zellverfallsprodukte ausgelöst wird. Da unter gewissen Voraussetzungen durch starke Bestrahlung sich im Experiment zeigen läßt, daß eine Reihe von fermentativen Vorgängen im Sinne einer Peptonvergiftung beeinflußt werden, liegt es nahe, auch den Röntgenkater als eine Proteinkörperwirkung, als eine Art proteoklastischer Autointoxikation, aufzufassen, wie es von einigen Autoren [*Müller*, l. c., *Bernhard* (40) und *Kohlmann* (41)] bereits geschehen ist.

Kohlmann z. B. hat beobachtet, daß der Röntgenkater um so stärker auftritt, je mehr Abbauprodukte durch Zellzerfall in den Kreislauf gelangen (z. B. bei Bestrahlung zerfallender Mediastinaltumoren). Bestrahlung der Milz, Lymphdrüsen und anderer blutreicher Organe soll nach *Kohlmann* einen Röntgenkater bewirken, der offenbar zentral ausgelöst wird.

Daß daneben trotzdem Veränderungen im Wasser- und Salzhaushalt für die Genese dieses Symptomenbildes wichtig sind, ist durchaus wahrscheinlich. So ist mir aus bisher nur teilweise veröffentlichten Versuchen *Döllkens* (42) bekannt, daß durch entsprechende Kationen- und Anionenpräparierung von Kaninchen und Meerschweinchen nach parenteraler Einverleibung eines Indikators von pharmakologisch unwirksamer Dosis sich experimentell anaphylaktoide Zustände auslösen lassen, die im Symptomenbild und in der graphisch

registrierten Beeinflussung der Vagusdepressorerregbarkeit völlig denen typisch anaphylaktischer Tiere gleichen, d. h., daß sich durch entsprechend gewählte Beeinflussung des Kationengleichgewichts Symptomenbilder erzielen lassen, die durchaus denen einer Proteinkörperwirkung bzw. Anaphylaxie analog sind.

Zusammenfassung.

Es wurde gefunden:

1. daß die postmortale Autolyse und Proteolyse (einer zugesetzten 5proz. Wittepeptonlösung) des Leber- und Lungenbreies röntgengeschädigter Meerschweinchen erheblich gesteigert ist;
2. daß das Serum dieser Tiere eine um ein Geringes über die Norm gesteigerte proteolytische Wirkung entfaltet und der antitryptische Titer höher ist als der der Seren normaler Tiere;
3. daß das Serum röntgengeschädigter Meerschweinchen im Hämolyseversuch keinen Unterschied gegenüber dem Serum von Normaltieren zeigt.

Es konnte kein Einfluß einer einmaligen Bestrahlung in vitro auf den Ablauf der Autolyse und Proteolyse normaler Breie festgestellt werden.

Ein Zusatz von Serum mehrfach röntgenbestrahlter Meerschweinchen zum Organbrei normaler Tiere steigert die postmortale Autolyse nicht, sondern hemmt deren Ablauf.

Werden diesen röntgenbestrahlten Meerschweinchen Bakterien (Tetragenus) injiziert und die Tiere 15 Minuten nach der Injektion getötet, so verhalten sich die Organbreie ähnlich wie die anaphylaktischer Tiere, d. h. die postmortale Leberautolyse wird stark gehemmt und kommt fast zum Stillstand (absteigend weniger stark gehemmt ist die postmortale Proteolyse der Leber und die postmortale Autolyse der Lunge, wohingegen die postmortale Proteolyse der Lunge etwas gesteigert ist). Gleichzeitig werden die Serumproteasen in ihrer Wirkung gehemmt, der antitryptische Titer stark erhöht.

60 Minuten nach der Injektion getötet, zeigen die Tiere bereits wieder gewisse Zeichen der Erholung. Postmortale Leberautolyse und Proteolyse sind noch immer deutlich, aber schwächer als im vorhergehenden Falle gehemmt. (Die postmortale Lungenautolyse hat fast normalen Ablauf erreicht, die postmortale Lungenproteolyse ist noch immer gesteigert.) Im Serum macht sich eine deutliche Hemmung der antitryptischen Wirkung geltend. — Ein anaphylaktischer Schock durch Sensibilisierung mit dem bei der Bestrahlung im Körper selbst zerfallenden Eiweiß konnte nicht erzeugt werden.

Literatur.

1) *Heile*, Arch. f. klin. Chirurg. **77**; Ref. Elektrother. u. Röntgenkunde 8. — 2) *Hajós* und *Hofhauser*, diese Zeitschr. **146**, 204, 1924. — 3) *Läwen*, Mitt. aus d. Grenzgeb. der Med. u. Chirurg. **19**. — 4) *Oeller*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923; Zeitschr. f. Krankheitsforschung **1**, 1. — 5) *Hedin*, Zeitschr. f. phys. Chem. **112**, 1920. — 6) *Hashimoto* und *Pick*, Arch. f. exper. Pharm. **76**, 1914. — 7) *Auer* und *van Slyke*, Zentralbl. f. Phys. **27**, 1913. — 8) *H. Meyer* und *Fr. Behring*, Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstr. **18**. — 9) *Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig, Verlag Thieme. — 10) *Quadrone*, Zentralbl. f inn. Med. **21** und **24**. — 11) *Benjamin* und *Sluka*, Wien. klin. Wochenschr. 1908. — 12) *Leidenfrost*, Zeitschr. f. Röntgenkunde **12**. — 13) *Keitler* und *Lindner*, Wien. klin. Wochenschr. 1914. — 14) *Manoukhine*, C. r. Soc. de Biol. 1913. — 15) *Fiorini* und *Zironi*, Arch. d'Electr. med. **378**; Strahlentherapie 1914, 1915. — 16) *Kaznelson* und *Lorant*, Münch. med. Wochenschr. 1921. — 17) *Schulze*, Med. Klinik 1912. — 18) *Fränkel* und *Schilling*, Berl. klin. Wochenschr. 1913. — 19) *Fränkel*, ebendaselbst 1912. — 20) *v. Heinrich*, Zentralbl. f. Bakt. **70**. — 21) *Hussey*, The influence of x-rays on the properties of blood Rep. from the Journ. of Gen. Phys. 1922. — 22) *Petersen* und *Saelhof*, Amer. Journ. of Röntg. 8, 1922. — 23) *Schierge*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 1924. — 24) *Baer* und *Loeb*, Arch. f. exper. Pathol. 1905. — 25) *Hedin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **112**, 252, 1920. — 26) *Bergmann* und *Meyer*, zitiert nach *Müller*, Serodiagn. Methoden. — 27) *Rosenthal* (zitiert nach *Pfeiffer* und *de Crinis*), Folia serol. 1910. — 28) *Bayliss*, Arch. des scienc. biol. **9**, Suppl. — 29) *Rusznyak*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 30. Deutsche med. Wochenschr. 1912. — 30) *Pfeiffer* und *Jarisch*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **16**. — 31) *Pfeiffer* und *de Crinis*, ebendaselbst **17**. — 32) *Klopstock*, Deutsch. med. Wochenschr. 1924. — 33) *Neuberg* und *Schwarz*, Berl. klin. Wochenschr. 1917; diese Zeitschr. **29**, 279, 1910. — 34) *Gaffron*, diese Zeitschr. **179**, 156, 1926. — 35) *Falta*, Strahlentherapie **2**. — 36) *Schinz*, 13. Tag d. deutsch. Röntg.-Ges., Ref. Münch. med. Wochenschr. 1922. — 37) *Müller*, Bruhns Beitr. **125**. — 38) *Brack*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1921. — 39) *Pick* und *Hashimoto*, ebendaselbst 1914. — 40) *Bernhard*, Klin. Wochenschrift 1923. — 41) *Kohlmann*, 13. Tag. d. Deutsch. Röntg.-Ges. — 42) *Döllken* und *Herzger*, Münch. med. Wochenschr. 1922. — 43) *Andersen* und *Emmerich*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **47**. — 44) *Andersen* und *Kohlmann*, Fortschr. auf d. Geb. d. Röntgenstrahlen **30**. — 45) *Knipping* und *Kowitz*, ebendaselbst **32**.

Bemerkungen zu den methodischen Angaben von Lorber in Bd. 181, Heft 4/6, 1927.

Von

Ludwig Pincussen.

(Eingegangen am 14. März 1927.)

Lorber macht auf Fehler aufmerksam, die sich in meiner „Mikromethodik" angeblich finden. Es ist hierzu zu bemerken:

1. Bei der Bestimmung der *Acetessigsäure* habe ich genau angegeben, daß das präformierte Aceton bei Zimmertemperatur abzudestillieren ist. Daß bei höherer Temperatur und saurer Reaktion Acetessigsäure zerfällt, braucht wohl keine Erwähnung.

2. Daß für die kolorimetrische *Bestimmung des Eisens* als Rhodaneisen die Acidität wichtig ist, dürfte wohl Allgemeingut der Chemiker sein. Aus diesem Grunde gebe ich eine der zu untersuchenden Probe entsprechende Ansäuerung der Testlösung an, die diesen Fehler eliminiert.

Ich bin stets dankbar, wenn ich auf irgend einen Fehler aufmerksam gemacht werde, kann aber andererseits wohl verlangen, daß man meine Angaben erst genau liest, bevor man sie — wie in diesem Falle — kritisiert.

Über die Empfindlichkeit vitaminarm ernährter Tiere gegen Arsenverbindungen.

Von

Alexander Gros.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg.)

(Eingegangen am 15. März 1927.)

Einleitung.

Obwohl die Literatur über Vitamine schon heute nahezu unübersehbar ist, scheint die Frage nach den Beziehungen der Avitaminosen zur Resistenz gegen Arzneimittel und Gifte noch kaum in Bearbeitung genommen zu sein.

Immerhin finden sich bereits mancherlei Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Ernährung und Arzneiwirkung verschiedenartiger Medikamente. So haben sich *Storm van Leeuwen* und *F. Verzár* (1) mit der Frage der Empfindlichkeit vitaminarm bzw. vitaminfrei ernährter Tiere gegen verschiedene Gifte befaßt. Sie benutzten Hühner und Katzen; erstere wurden einige Wochen lang mit poliertem Reis, letztere ausschließlich mit Fleisch, das alkalisch gemacht und im Autoklaven 3 Stunden lang auf 120° erhitzt worden war, ernährt. Bei diesen Tieren kam es zu Erscheinungen, die in erster Linie auf das Fehlen von „B"-Vitamin zurückzuführen waren, wenn auch ein gewisser Mangel an anderen Vitaminen im Spiel sein dürfte. Es trat bei Hühnern und bei Katzen nach vitaminfreier Kost eine voll ausgeprägte Polyneuritis auf. Geprüft wurden Nervengifte, wie Adrenalin, Histamin, Cholin und Atropin. Als überraschendes Ergebnis ließ sich feststellen, daß ein erheblicher Unterschied in bezug auf Blutdruckänderungen, Hemmung der Vagusreizung bei Atropin, Verhalten des isolierten Darms und Ösophagus nicht eintrat. Im Gegensatz hierzu fanden *Arloing* und *Dufourt* (2) bei Vitaminmangel an Tauben eine gewisse Empfindlichkeit gegen Adrenalin, Atropin, Pilocarpin, Mallein und Phosphor. Auch nach *Ragnar Berg* (3) wurde das Krankheitsbild bei avitaminösen Tauben durch Injektion von Phosphatgemischen verschlimmert. Dann sei auf einen Vortrag (4), dessen Inhalt in der mir zugänglichen Literatur nicht erschieenn war, hingewiesen, der ebenfalls die Beziehungen zwischen Avitaminosen und verschiedenen Giften behandelt. Sonstige Untersuchungen (5) befassen sich mit dem Zusammenhang zwischen Vitaminmangel zur Funktion der Schilddrüse und der Resistenz gegen Acetonitril. Auch die Jahreszeit spielt eine Rolle; so fand *R. Hunt* (6), daß Meerschweinchen gegen dieses Acetonitril im Frühjahr und im Sommer am

widerstandsfähigsten waren. *Bieling* (7) berichtet jetzt über Versuche, die sich auf das Verhalten von Avitaminosen zur Reaktion gegen Tetanus-, Botulismus- und Diphtherietoxine bezogen, ferner über die Empfänglichkeit gegen Milzbrand und Pneumokokken.

Dabei stellte sich heraus, daß bei unterernährten oder vitaminfrei ernährten Ratten gegen Tetanus und Botulismustoxin keine Veränderung in der Reaktion auftrat, während beim Diphtherietoxin die gesunden Ratten eine Menge vertrugen, die nahezu doppelt so groß war wie diejenige, welche gleich alte, ohne Vitamin ernährte Tiere tötete. Auch gegen Milzbrand und Pneumokokken war eine geringere Widerstandsfähigkeit da.

Bei diesen Avitaminosen liegen jedoch sicher nicht nur einfache Veränderungen in den Funktionen des Nervensystems vor, sondern auch tiefgreifende Störungen des Stoffwechsels; deshalb bieten gegenüber der erwähnten Nervengifte die Stoffwechselgifte, wie Phosphor und Arsen, ein erhöhtes Interesse. Hier handelt es sich, abgesehen von der allgemein biologischen Bedeutung, um ein auch praktisch sehr wichtiges Gebiet; es sei nur an die Eichung der Salvarsanpräparate durch Tierversuche und die therapeutische Verwendung der Arsenverbindungen in der Medizin erinnert. Nach der amerikanischen Prüfungsmethode (8) für Salvarsanpräparate sollen zur Toxizitätsbestimmung nur gut ernährte, gesunde, weiße Ratten von 100 bis 150 g Gewicht verwendet werden, und zwar sollen diese Tiere mit Weißbrot, zerquetschtem Hafer und Kuhmilch ernährt werden und wöchentlich dazu mageres Fleisch und Kohl erhalten. Für Trinkwasser muß stets Sorge getragen werden.

Seit den sorgfältigen und grundlegenden Arbeiten von *Reid Hunt* (9) ist die Bedeutung der jeweiligen Kostzusammensetzung für die Wirkung von Arzneimitteln und Giften wieder erneut in den Vordergrund gestellt worden. Besonders amerikanische Autoren haben in wertvollen Arbeiten der letzten Zeit dieses nicht nur pharmakologisch, sondern auch ärztlich wichtige Gebiet weiter ausgebaut. Mit der Toleranz der Arsenikalien bei verschieden zusammengesetzter Nahrung befaßt sich eine Studie von *Hooper*, *Kollis* und *Wreight* (10). Diese Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß hungernde Tiere und solche, die einige Tage vor intravenöser Einspritzung von Salvarsannatrium lediglich mit Zucker gefüttert worden waren, sich sehr empfindlich gegen diese Substanzen zeigten; in ähnlicher Weise fanden sie ungünstige Resultate bei Tieren, die nur mit magerem Herzmuskelfleisch oder mit Rohrzuckerlösung gefüttert waren, während Ernährung mit Weißbrot, Hafer und Vollmilch die Resistenz stark erhöhte und beispielsweise gegen Nierenschädigungen deutliche Schutzwirkung ausübte. Auch *Westrope* (11) fand, daß die Darreichung von Milch 24 Stunden vor der Salvarsaninjektion die Giftwirkung auf ein Minimum reduziere. Fütterung mit mittelfettem Fleisch scheint bei Hunden zum Auftreten schwerer — der akuten gelben Atrophie vergleichbaren — Leberschädigung durch tödliche Salvarsandosen zu disponieren. Diese Autoren fanden bei den in oben erwähnter Weise ernährten Tieren bei der Sektion die Lungen ödematös ausgedehnt; auch die Dünndarmschleimhaut war geschädigt. An den Nieren fanden sich zahlreiche Blutungen und als charakteristisches Zeichen Nekrose der Harnkanälchenepithelien. An der Leber zeigte sich Kernschwund der Zelle und zentrale Leberläppchennekrose.

Daß auch beim Menschen die Ernährung nicht ohne Einfluß auf den Charakter der Salvarsantherapie und ihre Wirkung ist, wurde schon frühzeitig erkannt und deshalb dem Ernährungszustande des Patienten bei

dieser Therapie erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt. So ist es bekannt, daß Alkoholmißbrauch die Empfindlichkeit des ganzen Organismus gegen Gifte jeglicher Art, besonders aber auch gegen das Salvarsan erhöht. Aus Versuchen, die *Jacobsohn* und *Sklarz* (13) am Kaninchen vornahmen, schlossen sie, daß man die Giftigkeit des Salvarsans durch Kaliumvorbehandlung erhöhen konnte, und haben deswegen die zahlreich auftretenden Schädigungen in der Nachkriegszeit zurückgeführt auf eine calciumarme und kaliumreiche, fast einseitige, vegetabilische Nahrung; diese Schädigungen bestanden hauptsächlich in Lebererkrankungen und Dermatitiden [*Jacobsohn* und *Sklarz* (14)]. *Zieler* (15) konnte in den Kriegsjahren und in der Zeit nach dem Kriege beobachten, daß die Exantheme weit häufiger und öfter auftraten, als es früher bei der Salvarsantherapie der Fall war, und bezog dies auf die unzureichende einseitige Ernährung und die damit verbundene herabgesetzte Widerstandsfähigkeit des Körpers. In ähnlicher Weise ist für den Ikterus, der während dieser Zeit sehr oft sich zeigte, die qualitativ und quantitativ minderwertige Kriegskost verantwortlich gemacht worden [*Albu* (16)]. Schädigungen, die manchmal auch beim Gesunden nach Salvarsaninjektionen vorkommen, aber verhältnismäßig harmloser Natur sind und schnell wieder vergehen (*Herxheimer*sche Reaktion), pflegen bei ernährungsgestörten Patienten reichlicher und in stärkerem Maße aufzutreten [*Dünzelmann-Wolde* (17)], ebenso wie sich in Bezug auf Salvarsan bei den schlecht oder nur einseitig ernährten Säuglingen leichter Magen- und Darmstörungen einstellen als beim kräftig ernährten Kinde.

Aus all diesen Versuchen kommt man zu der Schlußfolgerung, daß bei Verabreichung von Medikamenten, besonders der Arsengruppe, eine geeignete Ernährung von größter Bedeutung ist.

Eigene Untersuchungen.

Es war von besonderem Interesse, nun zu prüfen, ob und wieweit sich Tiere, denen bestimmte Vitamine in der Nahrung entzogen wurden, gegen Arsenikalien anders verhielten als die normal ernährten Kontrolltiere. Zu diesem Versuch wurden eigene Versuche an wachsenden weißen Ratten vorgenommen, die während eines Monats mit einseitiger Kost vorbehandelt waren. Diese Versuchstiere erhielten hierzu täglich eine Kost, die von *Mc Collum* (18), *Simmonds*, *Shipley* und *Park* angegeben ist und sich im hiesigen Institut in zahlreichen Versuchen sehr gut bewährt hat. Die Futtermischung, die gleichzeitig schwere Keratomalacie und Rachitis erzeugt, besteht aus:

40,0 Haferflocken,
5,0 Casein *Hammarsten*,
1,0 Chlornatrium,
3,0 Kohlensaurer Kalk,
51,0 Dextrin.

Wichtig ist insbesondere hier der höhere Gehalt an Kalk; denn geringere Zusätze von Calciumcarbonat erzeugen nur schwere Keratomalacie, aber keine rachitischen Erscheinungen, wie Rosenkranz, Auftreibung der Epiphysenenden der Röhrenknochen und Skoliose

der Wirbelsäule. Nach Ablauf von 3 Wochen konnte man denn auch bei diesen Tieren Augenerkrankungen (Xerophthalmie), ferner schleppenden, müden Gang, Verkrümmung der Wirbelsäule und geringe Gewichtsabnahme feststellen. Bei diesem Zustand der Tiere wurde mit der Einverleibung der verschiedenen Arsenverbindungen begonnen. Als erste Substanz wurde die Wirkung der arsenigen Säure geprüft, die den Tieren in einer 1proz. Lösung subkutan eingespritzt wurde. Nach *Hammett-Müller* (19) beträgt die tödliche Dosis für weiße Ratten 8 mg.

1. Versuche mit arseniger Säure (1proz. subkutan). Zeit: 28. Juli 1926; nachmittags 12 Uhr.

Nr.	Körpergewicht g	mg/kg	Injizierte Menge mg	Erscheinungen
		A. Normale Tiere.		
9	100	6	0,6	Keine Krankheitserscheinung: 3 Monate überlebt
10	100	8	0,8	Geringe Schwäche; überlebt 3 Monate
11	85	10	0,85	Schwäche etwas ausgeprägter; überlebt 3 Monate
18	110	15	1,65	† 5h10'; also 5 Std. 10 Min. nach der Einspritzung
19	100	20	2,0	† 5h. also 5 Std. nach der Einspritzung
		B. Kranke Tiere. (Zeit: 29. VII. 1926, nachmittags 12h).		
18	75	8	0,62	† 9. VIII., Tod also nach 11 Tagen
19	67	10	0,67	† 5. VIII., Tod also nach 7 Tagen
20	78	15	1,17	† 4h45'. Tod nach $4^3/_4$ Std.
21	80	20	1,6	† 4h30'. Tod nach $4^1/_2$ Std.

Normaltier 9 zeigte absolut keine Veränderung; bei dem gesunden Tier 10 konnte man ebenfalls nur wenig sehen; es war wohl 2 Tage lang etwas schläfrig und fraß weniger, erholte sich aber vom dritten Tage nach der Injektion zusehends. Etwas schlimmer war schon der Zustand von Nr. 11, das 10 mg/kg Körpergewicht erhalten hatte. Am Abend des Tages nach der Injektion saß das Tier erschöpft und gleichgültig gegenüber äußeren Reizen in einer Ecke und fuhr beim Beklopfen des Käfigs ängstlich und erschrocken zusammen. Dieser Zustand hielt einige Tage an. Vom 2. August 1926 an trat dann merkliche Besserung ein und das Tier gesundete vollkommen.

Die gesunden Tiere 18 und 19, die 15 mg und 20 mg/kg Körpergewicht erhalten hatten, gingen am gleichen Tage zugrunde. Man konnte äußerst heftige Zuckungen, Krämpfe und Gleichgewichtsstörungen erkennen. Unter denselben Erscheinungen gingen die kranken Tiere 20 und 23 zugrunde. Während nun die gesunden Tiere, die 6, 8, 10 mg pro Kilogramm Körpergewicht erhalten hatten, alle am Leben blieben und erst die Dosis von 15 mg/kg Körpergewicht tödlich wirkte, trat bei den vitaminarm ernährten Tieren der Tod schon bei einer weit geringeren Menge ein. Unter vollkommener Reaktionslosigkeit auf äußere Reize, zunehmender Appetitlosigkeit und erheblichen Störungen beim Laufen, sowie ausgeprägten Zuckungen starb vitaminarm 19 mit 10 mg/kg Körpergewicht am

5. August 1926, vitaminarm 18 am 9. August 1926. Hier zeigen sich also deutliche Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit gegen Arsendosen. Gaben, die beim kranken Tiere tödlich waren, bewirkten beim gesunden Tiere nur leichte Vergiftungserscheinungen.

2. Versuche mit Atoxyl (1proz. subkutan). Zeit: 27. Juli 1925.

Nr.	Körpergewicht g	mg/kg	Injizierte Menge mg	Erscheinungen
			A. Normale Tiere.	
1	77	50	3,85	Schwäche; überlebt 3 Monate
2	86	75	6,45	† 36 Std. nach der Einspritzung
3	116	100	11,6	Tod innerhalb 12 Std.
4	54	125	6,7	
5	58	150	8,7	
			B. Kranke Tiere.	
26	76	50	3,80	† 10. VIII.; Tod nach 14 Tagen
10	84	75	6,3	† 12 Std. nach der Einspritzung
67	58	100	5,8	Tod innerhalb 12 Std.
28	56	125	7,0	
68	52	150	7,8	

Bei diesem Mittel beträgt nach *Schomberg-Sieburg* (20) die größte ertragene Dosis 120 mg/kg Körpergewicht.

Bei den vitaminarm ernährten Tieren 67, 28, 68 konnte man 15 Minuten nach der Einspritzung auffallende Ermattung und Erschlaffung feststellen; sie blieben reaktionslos auf äußere Reize, hielten die Augen fortwährend geschlossen und zeigten deutliche Atemnot (Jugular- und Flankenatmung). Die gesunden Tiere 3, 4, 5 boten erst 4 bis 5 Stunden später ähnliche Symptome. Gegen Abend war bei beiden Tierarten kein Unterschied mehr wahrzunehmen, Atmung war kaum noch erkennbar und in der Nacht trat dann der Tod ein. Bei der Sektion fand sich starker entzündlicher Stauungsprozeß im Magendarmkanal und ödematöse Auftreibung der Lungen; die übrigen Organe waren ohne besonderen Befund.

Ein ähnlich schweres Krankheitsbild bot auch noch Ratte 10. Es bestand sehr große Atemnot und Unsicherheit in den Bewegungen. Sie vertrug Seitenlage und ging 12 Stunden nach der Einspritzung zugrunde. Fast die gleichen schweren Symptome wies das gesunde Vergleichstier am nächsten Tage auf; unter Störungen des Gleichgewichtssinnes erlag es 24 Stunden später als die vitaminarm ernährte Ratte. Bei dem gesunden Vergleichstier 1 und bei der kranken Ratte 26 konnte man tagelang bis zum 2. August dieselben Bilder sehen; beide saßen teilnahmslos im Käfig, hatten vermehrte Tränensekretion, geringe Freßlust, struppiges Fell und Unsicherheit der Bewegungen. Vom 3. August ab trat eine Änderung ein. Während von diesem Tage an das Normaltier sich zusehends erholte, tüchtig fraß, beim Herausnehmen aus dem Käfig Widerstand leistete und zu entschlüpfen suchte, wurde das Krankheitsbild bei dem vitaminarm ernährten Tier 26 immer schlimmer, die Atmung wurde schlechter und oberflächlicher, Nahrungsaufnahme war anscheinend nicht mehr vorhanden, beim Schütteln des Käfigs rollte es wie ein lebloser Gegenstand umher, bis es am 10. August starb. Auch aus diesen Versuchen scheint hervorzugehen, daß die Wider-

standsfähigkeit der vitaminarm ernährten Tiere gegen Atoxyl herabgesetzt ist.

Als drittes Mittel wurde die Wirkung des *Neosalvarsans* geprüft. Nach *Pearce-Brown* (21) beträgt hier für das gesunde Tier die höchst ertragene Dosis pro Kilogramm Körpergewicht 0,075 bis 0,1 g.

3. Versuche mit Neosalvarsan (1proz. subkutan). Zeit: 28. Juli 1926.

Nr.	Körpergewicht g	mg/kg	Injizierte Menge mg	Erscheinungen
			A. Gesunde Tiere.	
6	64	50	3,2	Überhaupt keine Erscheinungen; überlebt 3 Monate
7	83	75	6,2	Erkrankt; nach 5 Tagen Besserung; überlebt 3 Monate
8	75	100	7,5	† 30. VII., Tod nach 2 Tagen
			B. Kranke Tiere.	
11	70	75	5,25	† 8. VII., Tod nach 11 Tagen
9	80	100	8,0	† 30. VII., „ „ 2 „

Diese Injektionen mußten sehr schmerzhaft sein, denn die Tiere versuchten mit Gewalt zu entkommen und schrien laut auf. Am Tage der Injektion war keine krankhafte Veränderung zu sehen. Die Tiere waren lebhaft, sprangen im Käfig auf und ab und nahmen alle Nahrung zu sich. Im übrigen zeigte Normaltier 6 mit 50 mg/kg Körpergewicht während der ganzen Beobachtungsdauer keine pathologischen Erscheinungen. Normaltier 7 erkrankte am zweiten Tage nach der Injektion mit Reaktionslosigkeit gegenüber der Umgebung, Tränenträufeln und feinem Zittern des Kopfes. Diese Erscheinungen hielten noch einige Tage an, um dann zusehender Genesung Platz zu machen. Normaltier 8 mit 100 mg/kg Körpergewicht ging zugrunde. Dieses Tier wies am Tage nach der Injektion äußerst beträchtliche Zeichen der Giftwirkung auf; die Augen hielt es fortwährend geschlossen, lag vollkommen apathisch im Käfig und zeigte am ganzen Körper dieses eigenartige feine Zittern, das sich im Laufe der beiden folgenden Tage noch verstärkte, bis es am 30. Juli gegen Abend unter krampfartigen Zuckungen starb.

Im Gegensatz zu den normal ernährten Tieren machten sich bei allen kranken Tieren gleich am Nachmittag des Injektionstages deutliche Erschöpfungszustände geltend. Besonders vitaminarm 9 war stark ergriffen, das Tier hatte starke Bauchatmung, saß an einer Stelle und hielt den Kopf zwischen den beiden Vorderfüßen.

Ähnlich verhielt sich vitaminarm 11. Am 29. Juli 1926 war das Krankheitsbild bei beiden Tieren — besonders ausgeprägt bei dem kranken Tier 9 — stark verschlimmert. Atmung war kaum noch zu bemerken, der Kopf lag auf der Seite, der ganze Körper zeigte hier bei diesen Tieren heftiges Zittern, das immer stärker wurde, bis am 30. Juli 1926 unter lang anhaltenden Krämpfen der Tod eintrat. 11 Tage später ging auch vitaminarm 11 ein; die Lebenszeichen wurden immer schwächer, die Zuckungen und das heftige Zittern verstärkten sich. Das Tier wurde ganz steif und starb am 8. August 1926.

Die Sektion ergab bei sämtlichen Tieren, besonders auffallend bei den kranken, eine erhebliche Vergrößerung von Leber und Milz, sowie eine sehr ausgeprägte Rötung und Schwellung des Magendarmkanals. An den Nieren waren zahlreiche frische Blutungen zu erkennen und mikroskopisch Veränderung der Harnkanälchen.

Trotz der kleinen Anzahl von Versuchen scheint auch hier eine geringere Resistenz beim kranken Tiere vorhanden zu sein.

Zum Schluß wurden die Tiere noch geprüft auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen *Arsacetin*.

Zu diesem Zwecke wurde 0,1 g in 10 ccm Aqua dest. aufgelöst, so daß 1 ccm = 10 mg entspricht. Wenn auch bei diesen Verbindungen Erscheinungen spätestens am Tage nach der Injektion auftraten, so schien sich das Gift im Körper doch nur sehr allmählich auszubreiten und langsam zum Tode zu führen; so kam es, daß ein abschließendes Urteil darüber, wie die beiden Tiergattungen auf das Arsacetin reagierten, erst nach Wochen gesprochen werden konnte und viel mehr Tiere mit steigenden Mengen behandelt werden mußten.

4. Versuche mit Arsacetin.

A. Normale Tiere.

Nr.	Körpergewicht g	mg/kg	Injizierte Menge mg	Erscheinungen
			29. VII. 1926.	
12	87	75	6,52	Unruhe und Unsicherheit der Bewegungen; Parese d. Hinterbeine; Erholung vom 1. IX. an; überlebt 3 Monate
13	82	100	8,2	
14	115	150	17,2	
15	100	200	20	† 25. IX., Ursache fraglich
16	104	300	30	Ebenfalls Unruhe und Unsicherheit der Bewegungen; Parese der Hinterbeine stärker ausgeprägt; Erholung u. Gesundung v. 1. IX. an
17	94	450	42,3	
32	110	500	55	
			3. VIII. 1926.	
33	130	550	71,7	† 18. VIII. nach 15 Tagen
20	90	600	54,6	† 25. VIII. „ 25 „
21	115	650	74,0	† 12. VIII. „ 9 „
22	100	700	70,0	† 27. IX. „ 24 „
23	90	750	67,5	† 28. IX. „ 23 „
24	95	800	76,0	† 24. IX. „ 20 „
25	110	850	93,5	† 20. IX. „ 16 „

Da die Injektionsmenge zu groß wurde, wurde von nun an eine 5proz. Lösung gespritzt.

Nr.	Körpergewicht g	mg/kg	Injizierte Menge mg	Erscheinungen
			6. VIII. 1926.	
26	130	900	117,0	† 19. IX.
27	100	1000	120	† 18. IX.
28	135	1200	162	† 15. IX.
29	90	1500	135	† 11. IX.
30	120	1700	204	† 9. VIII.
31	150	2000	300	† 9. VIII.

B. Kranke Tiere.

Nr.	Körpergewicht g	mg/kg	Injizierte Menge mg	Erscheinungen
			29. VII. 1926.	
17	80	200	16	† 4. IX., Tod nach 37 Tagen
31	80	300	24	† 16. VIII., „ „ 18 „
25	90	450	40,5	† 8. VIII., „ „ 11 „
24	60	500	30,0	† 3. VIII., „ „ 5 „
			3. VIII. 1926.	
29	85	550	46	† 17. VIII., Tod nach 14 Tagen
30	80	600	48	† 15. VIII., „ „ 12 „
129	60	650	39	† 12. VIII., „ „ 9 „
			4. VIII. 1926.	
42	66	700	46,2	† 19. VIII., „ „ 15 „
46	86	750	64,6	† 15. VIII., „ „ 11 „
60	85	800	68	† 10. VIII., „ „ 6 „
			6. VIII. 1926.	
22	83	900	74,7	† 25. VIII., „ „ 19 „
59	98	1000	98	† 23. VIII., „ „ 17 „
58	84	1200	100,8	† 18. VIII., „ „ 12 „
143	60	1500	90	† 15. VIII., „ „ 9 „
70	55	1700	93,5	† 9. VIII., „ „ 2 „

Die Normaltiere waren am folgenden Tage sehr unruhig, kletterten auf die Futterkrippe und zeigten schon leichte Kreisebewegungen. Am nächsten Tage war diese Unruhe bedeutend stärker; außerdem konnte man beim Laufen eine Parese der Hinterbeine beobachten. Am Kopfe fiel ein eigenartiges Zittern auf, das sich im Laufe der Wochen über den ganzen Körper ausdehnte. Diese Erscheinungen boten die Tiere im gleichen Umfang 4 Wochen lang. Von September an konnte man dann bis Oktober fortschreitende Besserung und vollkommene Genesung wahrnehmen. Bei den Kontrolltieren 15, 16, 17, 32, die 200, 300, 450 und 500 mg erhalten hatten, waren die oben erwähnten Symptome bei weitem stärker ausgeprägt. Besonders lebhaft zeigten die vitaminarm ernährten Tiere 17, 31, 25 und 24, die die entsprechenden Mengen erhalten hatten, diese Erscheinungen, bei denen hauptsächlich der Tremor am ganzen Körper und die starke Parese der Hinterbeine auffiel.

Diejenigen Tiere, die von 550 mg/kg Körpergewicht Arsacetin in steigenden Mengen erhalten hatten, wiesen allerdings gleich am Tage der Injektion äußerst anschauliche Folgen der Giftwirkung auf. Starke Manegebewegungen verbunden mit „Kopfwackeln“ und fast ausgesprochene Lähmungen der Extremitäten waren die charakteristischen Merkmale. Dazu kamen noch die eigenartigen Drehbewegungen. Von den gesunden Ratten starb Nr. 25 mit 200 mg/kg Körpergewicht aus interkurrenten Gründen. Die restlichen gesunden Tiere, die von 550 bis 2000 mg/kg Körpergewicht Arsacetin erhalten hatten, gingen erst nach Ablauf von mindestens 10 Tagen zugrunde.

Nur die beiden letzten Ratten, die die hohen Dosen von 1700 und 2000 mg erhalten hatten, starben am übernächsten Tage. Im Gegensatz zu den gesunden Tieren zeigten die kranken Tiere die Vergiftungserscheinungen

viel deutlicher; auch starben sie an den Folgen des Giftes viel früher als die Kontrolltiere, die die gleichen Mengen am gleichen Tage erhalten hatten, und endlich gingen die vitaminarm ernährten Tiere bereits bei einer Dosis ein, die bei den gesunden Ratten nur vorübergehende Giftwirkung zur Folge hatte.

Am Ende meiner Ausführungen sind zwecks besserer Übersicht die Resultate der einzelnen Versuche nochmals zusammengestellt.

Substanz	Gesundes Tier	Vitaminarm ernährtes Tier
Arsenige Säure	8 mg/kg ohne Erscheinungen 15 „ tödlich	8 mg/kg tödlich
Atoxyl	50 „ schwere Vergiftung, dann Erholung	50 „ „
Neosalvarsan	75 mg/kg ohne Wirkung	75 „ „
Arsacetin	300 „ ohne Erscheinungen 550 „ tödlich	200 „ „

Zusammenfassung.

Bei Ratten, die durch vitaminarme Kost an Xerophthalmie und rachitischen Erscheinungen erkrankt waren, wurde die Giftigkeit von arseniger Säure, Neosalvarsan, Atoxyl und Arsacetin untersucht. Dabei ergab sich, daß bei diesen Tieren die tödlichen Dosen der genannten Substanzen niedriger waren als bei gesunden Kontrolltieren. Auch die Vergiftungserscheinungen waren viel schwerer. Besonders deutlich zeigte sich der Unterschied beim Arsacetin.

Die Versuche geben eine experimentelle Stütze für die Annahme, daß im Zustande der Avitaminose eine verringerte Widerstandsfähigkeit des Organismus vorhanden ist.

Literatur.

1) *W. Storm van Leeuwen* und *F. Verzár*, The journ. of Pharmacol. and exp. Ther. 18, 293, 1921. — 2) *F. Arloing* und *A. Dufourt* (zit. nach *Ragnar Berg*), „Die Vitamine", 2. Aufl., S. 160, 1927. — 3) *Ragnar Berg*, „Die Vitamine", 2. Aufl., S. 127, 1927. — 4) *M. J. Smith*, *W. F. Mc Closky* und *E. G. Hendrick*, Journ. of pharm. and exper. therap. 27, 251, 1926. — 5) *Cameron* und *Moore*, *Tsuji*, *Reid Hunt*, Literatur bei *C. Funk*, „Die Vitamine", 3. Aufl., S. 395, 1924. — 6) *R. Hunt*, U. S. publ. health. serv. 1910, bull. 69 (*Ragnar Berg*), Die Vitamine, S. 373. — 7) *Bieling*, Deutsch. med. Wochenschr., Jahrg. 53, Nr. 5, S. 182, Nr. 6, S. 228, 1927. — 8) Amerikanische Prüfungsmethode für Salvarsanpräparate (nach Kolle-Zielers Handb. d. Salvarsantherapie 1, S. 236. — 9) *R. Hunt*, Bull. 69, Hyg. Lab. Wash., S. 11 bis 93, 1910. — 10) *Charles W. Hooper*, *Alfred C. Collis* und *Dorothy Wright*, The journ. of Pharmacol. and exp. Ther. 18, 133, 1921. — 11) *Westrope* (zit. nach *Hooper*, *Collis* und *Wright*), The journ. of Pharmacol. and exp. Ther. 18, 134, 1921. — 12) *Caesar*, *B. Fischer*, *Desaux*, *Beaux-Lagrave*, *Boutelier*, *Barbier*, zit. nach *Kolle-Zieler*, Handb. d. Sal-

varsantherap. **1**, 165, 1924. — 13) *Jacobsohn* und *Sklarz*, ebendaselbst **2**, 319, 1924. — 14) *Dieselben*, ebendaselbst **2**, 166, 1924. — 15) *Kolle-Zieler*, Handb. d. Salvarsantherap. **2**, 119, 1924. — 16) *Albu*, zit. nach *Kolle-Zieler*, Handb. d. Salvarsantherap. **2**, 319, 1924. — 17) *Dünzelmann-Wolde*, ebendaselbst **2**, 91 und 93, 1924. — 18) *Wilhelm Stepp*, Ergebn. d. Physiol. **24**, 67 bis 70, 1925. — 19) *Hammett-Müller*, Novrey Journ. of Pharm. and exper. therap. S. 19338. — 20) *Schamberg*, Journ. of the Americ. med. assoc. **78** (6), 402 bis 404, 1922; zit. nach Ber. über die ges. Physiol. u. exper. Pharm. *Rona* XII, 1912; *Sieburg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **97**, 53, 1916. — 21) *Pearce-Brown*, zit. nach *Kolle-Zieler*, Handb. d. Salvarsantherap. **1**, 189, 1924.

Die Stimulationswirkung von Giften auf Pilze und das Arndt-Schulzsche Gesetz.

Von

Anneliese Niethammer.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 16. März 1927.)

Übersicht.

I. Darlegung der Problemstellung und der bekannten Erscheinung der Reizwirkung verschiedener Giftstoffe auf die Mycelentwicklung von Aspergillus niger und die Gärtätigkeit von Hefe.

Auf die Anwesenheit der Reizwirkung verschiedener Giftstoffe ist man im Pflanzenreich schon verhältnismäßig früh aufmerksam geworden.

Bereits 1869 konnte *Raulin* (1) experimentell zeigen, daß das Wachstum und die Mycelausbildung von Aspergillus niger durch geringe Dosen von Zink weitgehend gefördert werden kann. Der Entdecker dieser Tatsache verfiel allerdings in den verhängnisvollen Irrtum, Zink als unentbehrliches Nährelement aufzufassen und dessen obligatorische Anwendung bei der Herstellung geeigneter Nährlösungen zu fordern. *Molisch* und *Benecke* (2) (3) konnten bald zeigen, daß Zink in keiner Weise zur normalen Entwicklung nötig ist, daß es aber, in geringer Menge gereicht, ausgesprochen ertragsteigernd wirkt.

Die *Raulin*schen Versuche wurden in den späteren Jahren wiederholt nachgeprüft, und immer wieder zeigte sich der stark stimulierende Einfluß geringer Zinkmengen auf Aspergillus so prägnant, daß dieser Fall das Musterbeispiel einer Stimulationswirkung geworden ist.

Über Stimulationswirkungen verschiedener Giftstoffe auf die Gärtätigkeit von Hefe berichtet *H. Schulz* (4). Es wurden Metallsalze und organische Säuren geprüft. Alle geprüften Stoffe zeigten, vorausgesetzt, daß sie in entsprechender Verdünnung gereicht wurden, eine einheitliche *gärungsbeschleunigende* Wirkung. *Schulz* verallgemeinert seine Versuchsergebnisse sehr rasch und formuliert, obgleich seine Versuche weder an Zahl, noch Genauigkeit ausreichten, folgende allgemeine These von weitgehender Bedeutung: *Jeder* Reiz übt auf die Einzelzelle oder auf einen Zellkomplex einen Einfluß aus, der entweder eine Verminderung oder Vermehrung der physiologischen Leistungen bedingt, entsprechend der größeren oder geringeren Intensität des Reizes.

Einige Jahre früher hatte bereits *Arndt* (5) über die Reizwirkungen auf die tierische Zelle berichtet und ähnliche Ergebnisse erzielt, die sich in folgenden Satz zusammenfassen lassen: Schwache Reize fachen die Lebenstätigkeit an, mittelstarke fördern sie und starke heben sie auf.

Die an pflanzlichen und tierischen Zellen gewonnenen Erfahrungen wurden zusammengefaßt und die gemeinsamen Ergebnisse als das *Arndt-Schulz*sche Gesetz postuliert.

1896 hebt *Hueppe* (6) dieses sogenannte biologische Grundgesetz noch einmal ganz besonders hervor und propagiert folgenden Wortlaut: „Daß jeder Körper, der in bestimmten Konzentrationen Protoplasma tötet und vernichtet, in geringen Mengen die Entwicklungsfähigkeit aufhebt, aber in noch geringeren Mengen jenseits eines Indifferenzpunktes umgekehrt als Reiz wirkt und die Lebenseigenschaften erhöht."

Dieses hier formulierte biologische Grundgesetz muß, wenn es wirklich ein Naturgesetz ist, auf die verschiedenen Giftwirkungen im Pflanzenreich anwendbar sein. Es muß beispielsweise der Giftwirkung verschiedener Stoffe auf die Pilzentwicklung unbedingt bei entsprechender Verdünnung des Giftes eine Reizwirkung gegenüberstehen. Umgekehrt muß jede Reizwirkung bei höherer Konzentration in die Giftwirkung übergehen.

Wir wollen nun einmal diesen skizzierten Sonderfall bei der Pilzentwicklung vornehmen, zunächst die Ergebnisse der einschlägigen Literatur prüfen und im Anschluß daran trachten, durch eigene Versuchsberichte das Bild abzurunden. Bei einer derartigen Abhandlung darf man es nicht vergessen, auch in benachbarte Gebiete der Biologie einen Abstecher zu machen. Gerade in den letzten Jahren ist speziell unter medizinischem Gesichtswinkel viel über dieses biologische Grundgesetz gearbeitet worden. Natürlich können hier nur einzelne Angaben erfolgen; aber auch diese sind für uns nicht unwesentlich, denn jede Abweichung von der Allgemeingültigkeit trägt dazu bei, dem Gesetz seine Daseinsberechtigung zu entziehen.

II. Literaturübersicht.

1. *Allgemeines.*

Durch die in jüngster Zeit von *Zeller* und *Rolf Meier* vorgenommenen Untersuchungen, die eine exakte Nachprüfung der *Schulz*schen Versuche darstellten, wird das ganze Gesetz ins Wanken gebracht (7) (8). Die Nachuntersuchungen zeigen, daß die Versuchsanstellung von *Schulz* mehr als mangelhaft war, und daß die daraus resultierenden Ergebnisse keineswegs zu so weitgehenden Schlüssen berechtigen. Teils konnten bei diesen Nachuntersuchungen keine Förderungen festgestellt werden, teils sind sie ganz unbedeutend und liegen innerhalb der Fehlergrenzen. Einen vermittelnden Standpunkt nehmen die Ausführungen von *Joachimoglu* (9) ein. Die *Schulz*schen Versuchsergebnisse an gärenden Hefen konnten auch von ihm nicht bestätigt werden, dafür konnte er aber zeigen, daß einige andere Gifte der *Schulz*schen Regel folgen. Selbstverständlich wird auch von *Joachimoglu* betont, daß diese Ausnahmen bereits genügen, um die Bezeichnung Gesetz abzulehnen. Desgleichen unterziehen *Frick* und *Krüger* (10) die *Schulz*sche Formulierung einer strengen Kritik. Sie berichten über die Beeinflussung des Wachstums von Bacillus prodigiosus durch Röntgenstrahlen. Eine starke Strahlendosis wirkt schwer schädigend, eine das Wachstum fördernde Intensität konnte, obgleich das Spannungsbereich sehr weit war, nicht gefunden werden. Diese Mitteilungen zeigen abermals ein Versagen der Gültigkeit des Gesetzes, und es wird mit Recht von den Verfassern abgelehnt. *Heubner* (11) ist entschieden dagegen, die Existenz von Reizstoffen zu leugnen, ebenso unrichtig ist es aber seiner Ansicht nach, an die Möglichkeit von Reizwirkungen bei jedem Stoff zu glauben. Es ist jedenfalls Aufgabe der Zukunft, in diese Fragen Klarheit zu bringen. Weiter wird ausgeführt, daß man entschieden zwischen Reizstoffen für den Stoffwechsel normaler Zellen und solcher für Zellteilungsvorgänge scheiden muß. Für das Vorhandensein ersterer ist kein exakter Beweis erbracht, anders ist es mit der Stimulierung von Zellteilungsvorgängen. Es ist dabei an die Arbeiten von *Haberlandt* (12) zu denken, in denen gezeigt wird, daß eine Stimulierung durch Produkte verletzter Zellen möglich ist. Von da bedeutet es nur einen Schritt weiter, wenn auch körperfremde Stoffe solche Reize bedingen.

2. *Ergebnisse über die Stimulierung der Mycelentwicklung von Aspergillus niger durch Giftstoffe.*

Da es meine Aufgabe war, die Gültigkeit des *Arndt-Schulz*schen Gesetzes an dem klassischen Fall von Aspergillus niger zu prüfen, ist hier die Literatur lückenlos wiederzugeben.

Auf die grundlegende Arbeit von *Raulin* folgt aus dem *Pfeffer*schen Institut eine eingehende Untersuchung über den Einfluß verschiedener Giftstoffe auf die Ertragsvermehrung von Aspergillus niger. *Richards* (13) konnte zeigen, daß die Sulfate folgender Elemente in entsprechenden Verdünnungen ausgesprochen ertragsteigernd wirken: Zink, Eisen, Kobalt, Nickel. Dasselbe gilt für Natriumfluorid und Lithiumchlorid. Im Anschluß daran wurden auch einige organische Verbindungen, wie Morphium, Amygdalin, Cocain und Chloralhydrat, geprüft, die keine Reizwirkung erkennen ließen. Bei den anorganischen Verbindungen konnte also durchweg eine Reizwirkung festgestellt werden, dagegen blieb dieselbe für die geprüften organischen Verbindungen aus.

Leider wurden bei diesen Versuchsserien nie die bereits schädigenden Konzentrationen ermittelt. Diese Vernachlässigung stellt eine unliebsame Lücke in der Versuchsanordnung dar. Übrigens wurde nahezu bei allen einschlägigen Untersuchungen dieser Punkt vernachlässigt. Zusammenfassend kann man den *Richards*schen Versuchen keine lückenlose Bestätigung des *Arndt-Schulz*schen Gesetzes zuschreiben.

Im Jahre 1900 berichtet *Ono* über die stimulierende Wirkung verschiedener anorganischer Stoffe. Die daselbst mitgeteilten Befunde stellen eine weitgehende Bestätigung der *Richard*schen Versuche dar. Neu ist die Prüfung des Sublimats und des Kupfersulfats, beide wirken stimulierend. Die Angaben *Onos* (14) über den günstigen Einfluß geringer Kupfermengen auf die Entwicklung von Aspergillus niger stehen im Gegensatz zu *Richters* Beobachtungen (15), der *nie*, selbst bei sehr starker Verdünnung, eine anregende Wirkung feststellen konnte. *Richters* Arbeit bedeutet einen wesentlichen Fortschritt in der methodischen Bearbeitung dieses Arbeitsgebiets, da hier zum erstenmal darauf hingewiesen wird, daß bei derartigen Versuchen auch der Zeitfaktor zu berücksichtigen ist. Beispielsweise bei Zinksulfat ist das Maximum der Ertragssteigerung nach 4 bis 5 Tagen zu sehen. Seine Ausführungen, daß die Kulturen mit Zinksulfat, die viel rascher wachsen, auch wieder rascher dem Abbau verfallen werden als die ohne Zusatz, ist sehr einleuchtend und ebenso verständlich die daraus gezogene Schlußfolgerung, daß bei langer Versuchsdauer die Kultur mit Reizstoff, da sie schon im Zustande des Abbaues ist, ein niedrigeres Gewicht aufweisen wird, als die Kontrollkultur, die infolge des langsameren Wachstums noch nicht beim absteigenden Ast angelangt ist.

Auch hier läßt das Gesetz durch das Verhalten des Kupfersulfats eine neuerliche Ausnahme erkennen.

Wiederholt, vor allem in der französischen Literatur, wird der günstige Einfluß geringer Dosen von Manganosulfat hervorgehoben. Aus der Fülle der Einzelarbeiten sei hier nur die Studie von *Bertrand* und *Javillier* erwähnt (16). Manganosulfat stimuliert in Verdünnungen $^1/_{100000}$ bis $^1/_{100}$, die Entwicklung von Aspergillus niger, 1 : 50, schädigt bereits offensichtlich. Der hier mitgeteilte Fall paßt sehr gut in das Gesetz.

Der fördernde Einfluß des Zinksulfats bildet im Jahre 1914 den Gegenstand einer Arbeit von *E. G. Pringsheim* (17). Die dort mitgeteilten Erfahrungen sind sehr lehrreich, es wird zum erstenmal klar ausgesprochen, daß die Reizwirkung mit der Konzentration der Nährlösung in innigem Zusammenhange steht. Besonders bei *reichlicher* Ernährung macht sich die Reizwirkung kleiner Zinkmengen sehr schön bemerkbar.

Außer einer kleinen Arbeit von *Butkewitsch* und *Orloff*, die abermals den stimulierenden Einfluß der Salze von Zink, Sublimat und Kobalt hervorheben und dabei auch den Zeitfaktor berücksichtigen, ist zu dem Problem nichts mehr beigetragen worden (18).

Bevor auf eigene Erfahrungen eingegangen wird, muß nochmals der Stand der Dinge scharf umrissen werden. Bekannt ist, daß das Wachstum von Aspergillus niger durch geringe Giftdosen stimuliert werden kann. Nicht genau geprüft ist die Frage, ob diese Reizwirkung tatsächlich, wie das *Arndt-Schulz*sche Gesetz sagt, allen Giften ausnahmslos zukommt. Ist diese *Arndt-Schulz*sche Formulierung wirklich ein Gesetz, dann muß es auch restlos auf die Beeinflussung des

Wachstums von Aspergillus niger durch Gifte anwendbar sein. In der einschlägigen Literatur hat man die Anwendungsmöglichkeit dieses Gesetzes meistens gar nicht geprüft, vor allen Dingen hat man nie in einem zusammenhängenden Versuch stimulierende und schädigende Konzentration einander gegenübergestellt. Somit erschien es nicht ganz überflüssig, über diesen Punkt noch einige Versuchsserien anzuordnen, die möglichst schädigende und stimulierende Wirkung unter einem erkennen lassen, anzuordnen.

III. Alte und neue Versuchsergebnisse.

Die Anordnung des Tatsachenmaterials erfolgt in der Weise, daß zuerst anorganische und dann organische Substanzen behandelt werden. Zunächst wird über die Ergebnisse an Pilzkulturen berichtet, und dann wird im Anschluß daran teils aus eigener, teils aus fremder Erfahrung erzählt werden, wie sich der betreffende Stoff bei anderen physiologischen Prozessen, vor allem bei der Beeinflussung der Samenkeimung und dem Erwecken ruhender Winterknospen verhält. (Auf die stimulierende und schädigende Wirkung bei anderen Prozessen kann nicht eingegangen werden.)

Die Anstellung der Pilzversuche erfolgte in nachstehender Weise. Versuchsobjekt ist durchweg Aspergillus niger. Die Kultur selbst erfolgte in Erlenmeyerkölbchen von 100 ccm Inhalt aus böhmischem Kavalierglas im elektrischen Thermostaten bei genau 30° C. Die Nährlösung wurde mit Original-*Merck* und *Kahlbaum*-Reagenzien hergestellt. Die Stammlösung, die jeweils durch Wasser verdünnt wurde, worüber im einzelnen Falle berichtet wird, hatte folgende Zusammensetzung: 40 g Saccharose, 4 g Ammoniumsulfat, 0,4 g Magnesiumsulfat und 0,4 g primäres Kaliumphosphat gelöst auf 100 mit Wasser aufgefüllt. Es wurde nur doppelt destilliertes Wasser angewendet, das bei der zweiten Destillation von Jenaglas über einen Platinkühler wieder in Jenaglas destilliert wurde. Der Verschluß der Erlenmeyerkölbchen erfolgte mit reinem Zellstoff, der nach jedem Versuch ausgeschieden wurde. Besonderer Wert wurde auf das Impfen gelegt. Es wurde stets mit einer Sporenaufschwemmung, die in 1 ccm destillierten Wassers hergestellt wurde, geimpft, und zwar pro Kölbchen 1 Platinöse. Die hier mitgeteilten Zahlen stellen den Durchschnitt aus drei bis vier Einzelbeobachtungen dar.

A. Anorganische Stoffe.

Kupfersulfat.

20 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 8 Tage.

Ohne Zusatz	240 mg	Ohne Zusatz	609 mg
0,00001 Proz.	229 „	0,004 Proz.	576 „
0,00002 „	255 „	0,008 „	463 „
0,00005 „	241 „	0,016 „	428 „
0,0001 „	240 „		

Ein Vergleichsversuch, der mit einem Nährboden von 5 Proz. Saccharose angeordnet wurde, läßt desgleichen bei einer Versuchsdauer von 5 Tagen,

die nach *Richter* (l. c.) die optimale Zeit darstellt, keinerlei stimulierende Wirkung erkennen. Die Schädigung ist dagegen zu beobachten.

Kupfersulfat läßt demnach in diesem Falle die *Gift*wirkung erkennen, *ohne* daß ihr die nach *Arndt* und *Schulz* geforderte *Reiz*wirkung gegenübersteht.

Im Gegensatz dazu kann die Keimung bestimmter Früchte und Samen durch Kupfersulfat stimuliert werden. *Bokorny* (19) erwähnt beispielsweise, daß die Keimung von Gerste durch Zusatz ganz geringer Kupfersulfatmengen (0,0025 Proz.) ins Keimbett stimuliert werden kann. Dieselbe günstige Wirkung löst nach *A. Becker* ein einstündiges Einquellen der Weizenkörner in 0,05proz. Lösungen aus (20).

In Übereinstimmung mit *Bokorny* gibt auch *Noeldechen* (21) einen stimulierenden Einfluß von Kupfersulfat auf Gerste an. Diesen Reizwirkungen steht stets Giftwirkung bei höherer Konzentration gegenüber.

Daß die Gärtätigkeit der Hefe durch dieselbe Substanz erhöht werden kann, erwähnt *Schulz* (l. c.). Auch frühtreibend kann Kupfersulfat wirken, wie *O. Richter* (22) gezeigt hat. Nach *Beikirch* kann bei der Plasmaströmung die Zahl der strömenden Zellen vergrößert werden durch vorhergehendes Baden der Objekte in Kupfersulfatlösungen (23). Für alle diese hier erwähnten Reaktionen ist ebensogut, wie die Reizwirkung, auch die Giftwirkung bekannt. Nur die Entwicklung der Aspergillusdecken stellt eine Ausnahme dar, hier steht der Giftwirkung keine Reizwirkung gegenüber.

Silbernitrat.

5 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 5 Tage.

Ohne Zusatz	233 mg
0,00005 Proz.	291 „
0,0001 „	328 „
0,0005 „	238 „
0,001 „	156 „

Hier stehen die Giftwirkung und die Reizwirkung einander in einem Versuch sehr schön gegenüber. Die Samenkeimung kann nach *Grünfeld* (23a), wie er bei Desinfektionsversuchen beobachtete, durch Silbernitrat günstig beeinflußt werden. Die Plasmaströmung kann durch Silbernitrat nach *Beikirch* (l. c.) nicht beschleunigt werden. Sonst ist leider der Einfluß dieses Salzes bei pflanzenphysiologischen Reaktionen wenig geprüft worden.

Nickelsulfat.

10 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 8 Tage.

Ohne Zusatz	333 mg
0,0005 Proz.	374 „
0,001 „	377 „
0,005 „	250 „

Versuchsserien, die mit 5 Proz. Saccharose bei fünftägiger Kulturdauer und solche, die mit 20 Proz. Saccharose bei achttägiger Kulturdauer ausgeführt wurden, ließen ebenfalls nur die schädigende Wirkung des Nickels erkennen. Bei anderen physiologischen Prozessen, wie Frühtreiben und Samenkeimung, ist die Reizwirkung des Nickels leider nicht geprüft worden.

Bleinitrat.

5 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 5 Tage.

Ohne Zusatz	240 mg
0,00005 Proz.	304 „
0,0001 „	303 „
0,0005 „	346 „
0,001 „	293 „
0,01 „	142 „

Reiz- und Giftwirkung stehen hier abermals einander schön gegenüber. Desgleichen wird nach *Noeldechen* (l. c.) die Keimung von Gerste durch Bleiverbindungen in entsprechender Verdünnung stimuliert, ebenso ist dabei eine Schädigung bekannt.

Chromisulfat.

5 Proz. Saccharose. 5 Tage Versuchsdauer.

Ohne Zusatz	233 mg	Ohne Zusatz	316 mg
0,00005 Proz.	289 „	0,0005 Proz.	450 „
0,0001 „	342 „	0,01 „	271 „
0,0005 „	335 „	0,1 „	122 „
0,001 „	352 „		

Reiz- und Giftwirkung stehen auch hier einander sehr gut gegenüber. In anderen Gebieten ist über die Reizwirkung des Chroms leider nichts bekannt.

Zinksulfat.

5 Proz. Saccharose und 5 Tage Versuchsdauer lassen keine Reizwirkung, dafür aber Giftwirkung erkennen.

10 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 6 Tage.

Ohne Zusatz	109 mg	Ohne Zusatz	239 mg
0,001 Proz.	342 „	0,05 Proz.	204 „
0,005 „	427 „	0,1 „	131 „
0,01 „	322 „	0,2 „	66 „
		1 „	66 „
		2 „	kein Wachstum

20 Proz. Saccharose lassen auch sichere Reizwirkung erkennen.

Interessant ist hier, daß der Giftwirkung nur bei guter Ernährung eine Reizwirkung gegenübersteht. Bei mangelhafter Ernährung bleibt nur die Giftwirkung bestehen, ähnliche Beobachtungen werden wir auch noch später machen können.

Die stimulierende Wirkung des Zinksulfats auf die Samenkeimung ist von *Noeldechen* (l. c.) erwähnt und kann von Verfasserin bestätigt werden. Auch frühtreibend wirkt Zinksulfat, wie demnächst in einer eigenen Publikation gezeigt werden wird. Die Protoplasmaströmung wird nach *Beikirch* dagegen nicht günstig beeinflußt.

Manganosulfat. 5proz. Saccharoselösungen lassen ebensowenig wie bei Zinksulfat die stimulierende Wirkung erkennen. Die Schädigung kann dagegen auch in diesem Falle beobachtet werden. 10- und 20proz. Lösungen lassen von 0,001 bis 4 Proz. Manganosulfat einwandfrei Stimulierung erkennen. Interessant ist, daß so starke Manganosulfatmengen noch stimulierend wirken. Selbst bei den 5proz. Zuckerlösungen schädigen erst

4 Proz. Manganosulfat. Über die Manganwirkungen wird noch in einer gesonderten Publikation ausführlich berichtet werden.

Die frühtreibende Wirkung, ebenso die Möglichkeit der Stimulierung der Samenkeimung ist schon früher von Verfasserin (26) beschrieben worden. Desgleichen wird nach *Beikirch* die Plasmaströmung günstig beeinflußt.

Selen. Geprüft wurde eine Selenerde, die mir freundlichst von Herrn Dr. *Zimmermann* der Station für Pflanzenschutz, Tetschen Liebwerd, zur Verfügung gestellt wurde. 20 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 8 Tage. Auf je 50 ccm Nährflüssigkeit wurden 0,1 g Selenerde gereicht.

Ohne Zusatz	901 mg
Mit Zusatz	1521 „

Desgleichen konnte bei Triticum sativum (Postelberger Wechselweizen), wenn 50 g der Körner mit 0,1 g Selenerde durchgeschüttelt wurden und die Körner dann mit der anhaftenden Substanz bei 10° C ins Keimbett gebracht wurden, ausgesprochene Stimulierung des Keimungsverlaufs beobachtet werden.

Calciumhypochlorit (Chlorkalk). Bekanntes Pilz- und Bakteriengift. Selbst bei Anwendung starker Saccharosekonzentrationen konnte keine Stimulierung erzielt werden, obgleich sehr kleine Zusatzmengen (entsprechend 0,0005 Proz. Cl) geprüft wurden. Selbstverständlich wurden hier die Nährlösungen nicht sterilisiert, da sonst ein zu großer Chlorverlust eingetreten wäre.

Calciumchlorid.

10 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 7 Tage.

Ohne Zusatz	350 mg
0,005 Proz.	402 „
0,01 „	451 „
0,1 „	363 „

Bei 5 Proz. Saccharose blieb die Reizwirkung aus, Giftwirkung konnte aber auch dort nicht beobachtet werden.

Mit *Kaliumchlorid* wurden dieselben Ergebnisse erzielt wie mit Calciumchlorid.

B. Organische Stoffe.

Uspulun. Es handelt sich hier um ein organisches Quecksilberpräparat, das in der Pilz- und Bakterienbekämpfung praktisch eine große Rolle spielt.

5proz. Saccharoselösungen lassen auch hier wieder keine Reizwirkung erkennen, selbst bei einer Abstufung der Dosierung in die sechste Dezimale, dafür tritt bereits in der dritten Dezimale markante Giftwirkung auf.

10 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 7 Tage.

Ohne Zusatz	608 mg
0,00005 Proz.	760 „
0,00001 „	740 ,
0,0001 „	714 „
0,001 „	nahezu kein Wachstum mehr

20 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 8 Tage.

Ohne Zusatz	1008 mg
0,00001 Proz.	1304 „
0,00005 „	1401 „
0,0001 „	1350 „
0,001 „	234 „

Bei Darbietung einer reichlichen Nährstoffquelle steht auch hier wieder der Giftwirkung die Reizwirkung gegenüber. Bei ungenügender C-Quelle bleibt allerdings nur noch die Giftwirkung bestehen.

Als keimungsphysiologisches Beispiel sei hier Triticum sativum (Ungarisch Hradisch, weißähriger Moraviaweizen) erwähnt. 0,05proz. Lösungen, in die die Körner durch 1 Stunde eingequollen werden, bedingen in eigenen Versuchen, die mit je dreimal 50 Körnern bei einer mittleren Keimtemperatur von 10° im diffusen Licht aufgestellt wurden, eine beträchtliche Stimulierung des Keimungsverlaufs. Desgleichen gibt *A. Becker* (l. c.) die stimulierende Wirkung eines einstündigen Bades in 0,05proz. Lösungen für Triticum sativum, Sorte Original-Bordeaux-Sommerweizen an.

Desgleichen konnte beobachtet werden, daß bei Zimmertemperatur die Keimung von Chenopodium Quinoa ausgesprochen günstig beeinflußt wird.

Salicylsäure.

5 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 5 Tage.

Ohne Zusatz	131 mg	Ohne Zusatz . . .	240 mg
0,000 08 Proz. . . .	141 „	0,002 Proz. . . .	298 „
0,000 16 „ . . .	145 „	0,02 „ . . .	39 „
0,000 32 „ . . .	132 „		
0,001 2 „ . . .	204 „		
0,002 4 „ . . .	131 „		

H. Schulz hat gärungsbeschleunigenden Einfluß geringer Dosen Salicylsäure angegeben. Sonst erfolgte leider keine Prüfung der Reizwirkung der Salicylsäure.

Formaldehyd.

5 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 5 Tage.

Ohne Zusatz	158 mg	Ohne Zusatz . . .	244 mg
0,000 06 Proz. . . .	189 „	0,001 Proz. . . .	377 „
0,000 12 „ . . .	189 „	0,05 „ . . .	kein Wachstum mehr
0,001 „ . . .	177 „		

Durch *Borvesch* (24) ist die fruchttreibende Wirkung des Formaldehyds bekannt. Bei der Samenkeimung berichtet *Bokorny* (l. c.) nur über die schädigende Wirkung.

Thymol.

5 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 5 Tage.

Ohne Zusatz	177 mg
0,000 05 Proz.	230 „
0,000 1 „	266 „
0,000 5 „	219 „
0,001 „	206 „
0,005 „	113 „

In den beiden anderen Gebieten wurde die stimulierende Wirkung nie geprüft.

Phenol.

20 Proz. Saccharose. Versuchsdauer 8 Tage.

Ohne Zusatz	145 mg	0,001 Proz.	132 mg
0,000 05 Proz.	148 „	0,005 „	120 „
0,000 1 „	155 „	0,01 „	95 „
0,000 5 „	155 „		



Die Giftwirkung ist vorhanden, ohne daß ihr hier eine sichere Reizwirkung gegenübersteht. Bei der Samenkeimung wird von *Bokorny* und *Sigmund* (25) nur über die Giftwirkung berichtet.

IV. Besprechung.

1. Aufzählung der bis dahin nicht geprüften Reizwirkung einiger Giftstoffe.

Von anorganischen Stoffen wurde bei folgenden Giften und Verbindungen zum erstenmal die Reizwirkung hinsichtlich der Mycelentwicklung von Aspergillus niger geprüft:

Silbernitrat,
Bleinitrat,
Chromisulfat,
Kalium- und Calciumchlorid.

Überhaupt wurde zum erstenmal auf die Möglichkeit einer Stimulierung des Pilzwachstums und der Samenkeimung durch Selenerde hingewiesen.

Von organischen Stoffen wurde die Reizwirkung bezüglich der Ausbildung des Pilzmycels für folgende Verbindungen erkannt:

Uspulun,
Formaldehyd,
Salicylsäure,
Thymol.

Alle diese Stoffe, die in unseren Versuchen eine ausgesprochene stimulierende Wirkung entfalteten, sind andererseits, wenn sie in entsprechender Konzentration gereicht werden, schwere Pilz- und Bakteriengifte, ausgenommen das Kalium- und Calciumchlorid.

2. Hervorheben der übereinstimmenden Wirkung eines Reizstoffes bei verschiedenen physiologischen Prozessen.

Der hier erfolgte Bericht zeigt auch, daß ein und derselbe Giftstoff in entsprechender Verdünnung bei verschiedenen physiologischen Prozessen stimulierend wirken kann. Beispielsweise das bekannte Steinbrandbekämpfungsmittel *Uspulun*, dessen stimulierende Wirkung auf das verschiedenste Saatgut in der landwirtschaftlichen Literatur wiederholt hervorgehoben wird (26), kann auch auf das Wachstum von Aspergillus, in geeigneter Verdünnung gereicht, stimulierend wirken. Für die Keimung der Brandsporen konnte bereits *Gassner* (27) zeigen, daß der Giftwirkung des Uspuluns auch eine *Reiz*wirkung gegenübersteht.

Umgekehrt wurde Zinksulfat, das das typische Stimulans für die Entwicklung von Aspergillus niger ist, hier zum erstenmal auch als keimungsförderndes und frühtreibendes Agens erkannt. Desgleichen konnte für Bleinitrat im Anschluß an fremde Versuchsergebnisse und

Selenerde durch eigene Beobachtungen eine derartig gemeinsame Wirkungsweise angegeben werden.

Silbernitrat ist leider bezüglich seiner *Reiz*wirkung auf die Samenkeimung nie eingehender geprüft worden, die spärlichen Angaben lassen aber bereits auch hier eine Stimulationsmöglichkeit erkennen. Die Mycelentwicklung von Aspergillus niger wird durch Silbernitrat ausgesprochen günstig beeinflußt.

Für Manganosulfat konnte ich bereits in früheren Publikationen (l. c.) die Stimulationswirkung auf ruhende Knospen und bestimmte Samen angeben. Hier ist nun im Anschluß an frühere Versuchsergebnisse, die meistens von französischer Seite stammen und in den Comptes rendus niedergelegt sind, nochmals der günstige Einfluß auf das Pilzwachstum hervorgehoben.

Kupfersulfat läßt eine Ausnahme erkennen, es wirkt, wie in der Zusammenfassung angegeben ist, bei verschiedenen anderen Reaktionen ausgesprochen stimulierend, bei Aspergillus konnte nur die Giftwirkung beobachtet werden, der keine Reizwirkung gegenübersteht.

Über die Auslösung und das Wesen derartiger Reizerscheinungen soll hier vorläufig nicht diskutiert werden. Im Anschluß an diese allgemeine Betrachtung werden nun bekannte und neue Reizstoffe bezüglich ihres Einflusses auf verschiedene physiologische Prozesse geprüft werden. Über jedes einzelne Gebiet wird in einer Sonderdarstellung berichtet und im Anschluß daran auch getrachtet werden, zur theoretischen Seite des Problems beizutragen.

Dadurch wird auch die Bedeutung des *Schulz-Arndt*schen Gesetzes klarer werden, zu dem aber schon hier Stellung genommen werden soll.

3. *Stellungnahme zum Arndt-Schulzschen Gesetz.*

Die meisten hier geprüften Giftstoffe lassen typische Reizwirkungen erkennen, wobei hervorzuheben ist, daß von mir sowohl die stimulierende wie die schädigende Dosis ermittelt wurde. Auch bei den Keimversuchen steht meist der Reizwirkung die Giftwirkung gegenüber.

Aber vor allem bei den Pilzversuchen, auf die hier näher eingegangen ist, zeigen sich auch *Ausnahmen*, und zwar zweierlei Art.

Die einen Giftstoffe lassen die *Reiz*wirkung nur bei *guter Ernährung* erkennen. Das gilt für *Uspulun*, *Zinksulfat* und *Manganosulfat*. Bei einem Nährboden, der nur 5 Proz. Zuckergehalt hat, bleibt die Reizwirkung aus, ohne daß die Giftwirkung fehlte. Auch bei der Samenkeimung kann man beobachten, daß die Reizwirkung nicht immer der Giftwirkung gegenübersteht. Bei hoher Keimtemperatur keimt Weizen sehr rasch, die Giftwirkung ist bei diesem raschen Keimungsverlauf beispielsweise bei Uspulun ohne weiteres feststellbar, wogegen die Reizwirkung nur bei einem durch tiefe Temperatur verlangsamten Keimungsverlauf noch sichtbar ist.

Damit wären die einen Ausnahmen charakterisiert, die, wenn man sich so ausdrücken darf, nur bei einem gewissen Zustande des Nährmediums oder der Umwelt auftreten.

In zweiter Linie ist dann noch der Stoffe zu gedenken, die *überhaupt* keine der Giftwirkung gegenüberstehende Reizwirkung erkennen lassen.

Zu diesen gehören: Phenol, Kupfersulfat, Nickelsulfat und Chlorkalk. Die hier zitierten Ausnahmen genügen jedenfalls schon, um zu zeigen, daß die Aufstellung eines derart allgemein gültigen Gesetzes verfrüht war. Die These, daß *jedes Gift in geeigneter Verdünnung auch als Stimulans wirken* muß, ist jedenfalls energisch abzulehnen. Es ist in diesem Zusammenhang auch hervorzuheben, daß es gewisse Stoffe gibt, die man keineswegs unter die Gifte reihen kann und die in geeigneter Verdünnung sehr gut stimulieren können, so die Chloride.

Recht allgemein läßt sich die *Schulz-Arndt*sche Formulierung bei der Samenkeimung anwenden, aber auch da gibt es Ausnahmen, wie beispielsweise der Formaldehyd, der nach *Bokorny* ein starkes Gift für die Keimlinge ist, ohne daß eine Reizwirkung erkannt werden konnte.

Soweit ich die Literatur überblicken kann, gilt die *Arndt-Schulz*sche These lückenlos für die verschiedenen Treibstimulantia, hier steht der günstigsten Dosis sehr rasch eine schädigende gegenüber.

Wenn wir zum Schluß nochmals auf die Kulturversuche an Pilzen zurückkommen wollen, so muß noch eigen erwähnt werden, daß die Abstufung der Konzentrationen nach beiden Richtungen so weit ging, daß eine etwa vorhandene Förderung kaum hätte übersehen werden können. Es erscheint beinahe unglaubhaft, daß *Schulz* (l. c.) mit so schwachen Lösungen (die Konzentrationsstufe lag in der fünften Dezimale) so *ausgesprochene Reizwirkungen* erzielte, um so mehr als die Versuche einer Zeit entstammen (1888), in der es mit der Methodik viel schlechter bestellt war, als heute. Selbst heute ist es noch schwer, bei Ansetzung derartiger Kulturen den nötigen Grad an Reinheit der Substanz, des Wassers und des Glases zu erreichen, damals war dies entschieden noch viel schwerer.

Prüft man einmal, was zu diesem Thema beigetragen ist, so muß man zugeben, daß es eigentlich recht wenig ist und in *keiner Weise zur Formulierung von biologischen Grundgesetzen genügt.* Wenn man angibt, daß ganz *allgemein* Gifte in kleinen Dosen stimulierend wirken, so muß man sich dabei auch auf ein ausreichendes Tatsachenmaterial stützen können und keine unbewiesene These aufstellen. Vor allem muß man erwähnen, ob dieses Gesetz überall gilt oder nur für einen bestimmten physiologischen Prozeß, und hier vielleicht wieder nur unter bestimmten Bedingungen.

Die Formulierung des *Arndt-Schulz*schen Gesetzes ist jedenfalls bisher zu allgemein gefaßt worden, denn man hat sich nicht der Mühe unterzogen, die nähere Anwendung auf verschiedenen Gebieten zu

probieren, bevor man ein Gesetz aufstellt. Jetzt muß man den umgekehrten Weg einschlagen und einen Fall nach dem anderen schildern, wo das Gesetz *nicht* gilt, wie das aus der früher zitierten Literatur und den hier mitgeteilten Versuchsergebnissen zu ersehen ist.

V. Zusammenfassung.

1. Einige Giftstoffe wurden hier zum erstenmal bezüglich ihrer Reizwirkung auf das Wachstum von Aspergillus niger geprüft. Es sind dies: Uspulun, Chromisulfat, Silbernitrat, Bleinitrat, Formaldehyd, Salicylsäure und Thymol.

2. Ferner konnte gezeigt werden, daß ein und derselbe *Giftstoff* verschiedene physiologische Prozesse in der gleich günstigen Weise stimulieren kann.

3. Das *Arndt-Schulz*sche Gesetz muß für die Beeinflussung des Pilzwachstums durch Giftstoffe abgelehnt werden, da eine Anzahl der geprüften Stoffe dem erwähnten Gesetz nicht folgt.

Literatur.

1) *Raulin*, An. sc. nat. Bot., Serie 5, 1869. — 2) *H. Molisch*, Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien 1894. — 3) *W. Benecke*, Jahrb. f. wiss. Bot. **28**, 487, 1895. — 4) *H. Schulz*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **42**, 517, 1888. — 5) *Arndt*, Biologische Studien, Greifswald 1882. — 6) *F. Hueppe*, Naturw. Einführung i. d. Bakteriol. Wiesbaden 1896. — 7) *J. Zeller*, diese Zeitschr. **171**, 43, 1926. — 8) *R. Meier*, ebendaselbst **174**, 385, 1926. — 9) *Joachimoglu*, ebendaselbst **79**, 144, 1917; **130**, 239, 1922. — 10) *K. Frick* und *R. Krüger*. Zeitschr. f. klin. Med. **99**, 264, 1924. — 11) *Heubner*, Klin. Wochenschr, 1926, S. 1. — 12) *G. Haberlandt*, Biol. Zentralbl. **42**, 145, 1922. — 13) *M. Richards*, Jahrb. f. wiss. Bot. **30**, 665, 1897. — 14) *N. Ono*, Bakt. Zentralbl., II. Abt., **9**, 154, 1902. — 15) *A. Richter*, ebendaselbst **7**, 417, 1901. — 16) *Bertrand* und *Javillier*, C. r. de l'Acad. de Paris **152**, 225, 900, 1911. — 17) *E. G. Pringsheim*, Zeitschr. f. Bot. **6**, 577, 1914. — 18) *Orloff-Butkewitsch*, diese Zeitschr. **132**, 556, 1921. — 19) *Th. Bokorny*, ebendaselbst **50**, 1, 1913. — 20) *A. Becker*, Landw. Jahrb. 1926. — 21) *Noeldechen*, Kühns Arch. **9**, 264, 1926. — 22) *O. Richter*, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **40**, 43, 1922. — 23) *Beikirch*, Bot. Arch. **12**, 390, 1926. — 23a) *O. Grünfeld*, Beihefte z. Bot. Zentralbl. 1926. — 24) *K. Boresch*, diese Zeitschr. **170**, 466, 1926. — 25) *W. Sigmund*, Landw. Versuchsst. **47**, 1, 1896. — 26) *A. Niethammer*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Teil A, 1926; diese Zeitschr. **177**, 418, 1926; Jahrb. f. wiss. Bot. **66**, 284, 1927. — 27) *G. Gassner*, Zellstimulationsforschungen **1**, 461, 1925.

Über die Darstellung und pharmakologische Wirkung der Triacetyl-pyrogallol-o-carbonsäure.

Von

Sigmund Fränkel.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 17. März 1927.)

Bekanntlich sind von den drei möglichen Oxybenzoesäuren nicht alle gleich physiologisch wirksam. Die Orthoverbindung (Salicylsäure) ist die weitaus wirksamste, während die meta- und para-Verbindungen physiologisch fast unwirksam sind.

Durch Acetylierung der Salicylsäure erhält man eine physiologisch sehr wirksame Verbindung, welche unter dem Namen Aspirin wegen ihrer narkotischen Wirkung eine ganz ungeahnte Verbreitung in der Therapie gefunden hat.

Es war nun interessant, zu untersuchen, ob die Anreicherung der Acetylsalicylsäure mit weiteren orthoständigen acetylierten Hydroxylgruppen eine Erhöhung der Wirkung zur Folge hat.

Zu diesem Zwecke wurde die Diacetylbrenzcatechinorthocarbonsäure[1]) hergestellt. Nach den Angaben dieser Patentschrift wird die entfiebernde Wirkung der Brenzcatechincarbonsäure und ihrer Kernhomologen durch Acetylierung bedeutend verstärkt. Bei klinischen Versuchen soll die Diacetylbrenzcatechin-o-carbonsäure Patienten 10 bis 30 Stunden fieberfrei gehalten haben, während die gebräuchlichen Antipyretica nur 3 Stunden wirkten. Auch die narkotische Wirkung der Substanz soll die der Acetylsalicylsäure übertreffen. Doch hat man von dieser Verbindung in der Therapie nie wieder etwas gehört. Wenn die Angaben richtig gewesen wären, so hätte eine weitere Einführung von orthoständigen Hydroxylgruppen und Acetylierung derselben eine womöglich noch höhere Wirkung zeigen müssen.

Um dies zu untersuchen, haben wir die Triacetylpyrogallol-o-carbonsäure dargestellt.

---

[1]) Nach dem D. R.-P. 287 960.

Die dazu notwendige Pyrogallolcarbonsäure haben wir in folgender Weise dargestellt[1]).

1 Teil Pyrogallol, 10 Teile Wasser und 4 Teile Natriumbicarbonat werden so lange gekocht, bis die Gasentwicklung aufgehört hat. Dann wird schnell abgekühlt und mit Schwefelsäure versetzt bis zur stark sauren Kongoreaktion. Man läßt dann stehen und nutscht ab und kristallisiert aus viel Wasser mit etwas Tierkohle um. Die getrocknete Substanz beginnt sich bei 200° zu zersetzen.

Zur Acetylierung wurde mit der drei- bis vierfachen Menge Essigsäureanhydrid unter Rückfluß gekocht und das Reaktionsprodukt im Vakuum vom überschüssigen Essigsäureanhydrid und von der Essigsäure vollständig befreit. Der Rückstand wurde aus Xylol umkristallisiert, welches Lösungsmittel von allen versuchten sich am besten bewährte. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus diesem Lösungsmittel erhielten wir eine Substanz vom konstanten Schmelzpunkt 164°.

Die Substanz war geschmacklos und in Wasser sehr wenig löslich.

Die Analyse gab folgende Werte:

3,815 mg Substanz: 7,410 mg CO_2, 1,260 mg H_2O.
3,470 „ „ 6,720 „ CO_2, 1,190 „ H_2O.

$C_{13}H_{12}O_8$. Ber.: C = 52,73 Proz., H = 4,08 Proz.
Gef.: C = 53,01 „ H = 3,70 „
C = 52,86 „ H = 3,86 „

Im Kaninchenversuch wurden per os 3 g pro 1 kg Tier gegeben ohne äußeres Zeichen einer Wirkung und glatt vertragen. Beim fiebernden Tier wurde die Temperaturherabsetzung mit der durch Aspirin bewirkten verglichen. Eine Dosis von 0,25 g der Triacetylpyrogallolcarbonsäure setzte die Temperatur um 0,2° herunter, während Aspirin um 0,50° heruntersetzte.

0,5 g setzten um 0,4° herunter, während Aspirin um 1,4° heruntersetzte. 0,75 g setzten um 1,1° herunter, während Aspirin um 1,6° heruntersetzte. Erst die 1-g-Dosis setzt um 1,6° herab, während Aspirin um 1,7° herabsetzt.

Es ist demnach die antipyretische Wirkung eher etwas geringer als die des Aspirins. Das gleiche gilt von der narkotischen Wirkung. Im klinischen Versuch wurde das Präparat bei einer Frau mit Schmerzen und Schwellungen in den Gelenken versucht. Gaben von 1 bis 2 g wurden glatt vertragen. Die Schmerzen schienen geringer zu sein, gegen die Schwellung war es ohne Wirkung. Aspirin, welches einige Tage später verwendet wurde, zeigte vollen Erfolg.

Man ersieht aus diesen Versuchen, daß die Anreicherung mit acetylierten, orthoständigen Hydroxylgruppen dem Aspirin gegenüber keinerlei Vorteile, hingegen eine Abschwächung der Wirkung hervorruft.

---

[1]) *Brunner* und *Senhofer*, Monatshefte für Chemie 1, 474.

Über Anoxybiose von Leucocyten.

Von

W. Fleischmann.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 17. März 1927.)

Die Leucocyten haben neben ihrer Sauerstoffatmung ein erhebliches glykolytisches Vermögen, welches als Quelle ihrer Energie in Betracht kommt [*Bakker*[1]), *Fleischmann* und *Kubowitz*[2])]. Insbesondere die Zellen steriler Exsudate zeigen ein Überwiegen des Spaltungsstoffwechsels über den oxydativen Stoffwechsel, wie *Bakker* und *wir* mittels verschiedener Methoden übereinstimmend zeigen konnten. Nach unseren Messungen sind Exsudatleucocyten vom Kaninchen imstande, unter anaeroben Bedingungen bis zu 12 Proz. ihres Trockengewichts an Milchsäure in der Stunde zu bilden.

Es entstand nun die Frage, ob dieser anaerobe Stoffwechsel auch ausreicht, um die Funktion der Zelle zu erhalten. Als Ausdruck der Funktionsfähigkeit von Leucocyten sehen wir amöboide Bewegung und die Phagocytose fester Teilchen an, als weiteres Kriterium des Lebens der Zelle die vitale Granulafärbung mit Neutralrot [*Haberlandt*[3]), *v. Möllendorf*[4])].

Zur isolierten Ausschaltung der Atmung wandten wir Blausäure an. HCN in schwachen Konzentrationen hemmt die Zellatmung vollständig, ohne die Glykolyse zu hemmen [*Warburg*[5]), *Rona*[6]), *Oppenheimer*[7])].

In der Literatur finden sich wenige Angaben über die Bedeutung des Sauerstoffs für das Leben der Leucocyten. *Engelmann*[8]) berichtet, daß

---

[1]) *A. Bakker*, Inaug.-Diss. Groningen 1926; Klin. Wochenschr. **6**, 252, 1927.

[2]) *W. Fleischmann* und *F. Kubowitz*, diese Zeitschr. **181**, 395, 1927.

[3]) *L. Haberlandt*, Zeitschr. f. Biol. **69**, 331, 1919.

[4]) *v. Möllendorf*, Abderhaldens Arbeitsmethod., Abt. V, Teil 2.

[5]) *O. Warburg*, Stoffwechsel der Tumoren, S. 101. Berlin 1926.

[6]) *P. Rona*, Fermentmethoden, S. 204. Berlin 1926.

[7]) *C. Oppenheimer*, Die Fermente, S. 1410. Berlin 1925.

[8]) *Th. W. Engelmann*, Hermanns Handb. d. Phys. **1**, 362. Leipzig 1879.



kontraktile Zellen aus den Lymphsäcken des Frosches erst nach zweistündigem Durchleiten von reinstem Wasserstoff durch die hermetisch geschlossene Kammer bewegungslos, dabei meist kugelig werden. Das Lehrbuch der Physiologie von *Landois-Rosemann*[1]) enthält die Angabe, daß O_2 für die Bewegung der Leucocyten notwendig sei. *L. Loeb*[2]) beobachtete, daß Blutzellen von Limulus bei einem Zusatz von m/80 bis m/150 KCN zu einer $^5/_8$ mol. NaCl-Lösung wohl erhalten blieben und, wenn auch verringerte, Ausstreckung von Pseudopodien zeigten. *Loeb* hat die Frage der Zellatmung nicht berührt, doch können wir nach den Erfahrungen an anderen Zellen annehmen, daß bei dieser KCN-Konzentration die Atmung ausgeschaltet war.

Wir bedienten uns folgender Methodik:

Gewinnung der Leucocyten aus Pferdeblut oder aus sterilem Peritonealexsudat nach *Hamburger*[3]) wie zu unseren Versuchen über Phagocytose[4]). Die Leucocyten wurden nicht gewaschen; der citrathaltigen Suspension wurde NaCN in einer Menge zugesetzt, daß die Flüssigkeit einer m/200 HCN-Lösung entsprach. Bei dieser Konzentration der Blausäure war keine Atmung, wohl aber Gärung nachweisbar. [Die manometrische Bestimmung nach *Warburg* ergab für polynucleäre Exsudatleucocyten vom Kaninchen: ($Q_{O_2} = 0$, $Q_M^{N_2} = 24$).] Die Leucocytensuspension wurde nach Zusatz der Blausäure 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen, sodann mit feingepulvertem Karmin versetzt und im Brutschrank 2 Stunden bei 37,5° belassen. (Ein Versuch wurde bei minimalem O_2-Druck in einem Tonometer durchgeführt.) Die Zellen wurden durch Zusatz einer 10proz. Formollösung fixiert. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigten sie zahlreiche amöboide Fortsätze mit maximaler Speicherung von Karminkörnchen. Das Bild unterschied sich in keiner Weise von dem nicht mit Blausäure vergifteter Zellen. Nicht mit Formol fixierte Zellen zeigten bei Färbung mit Neutralrot (1 : 5000) Granulafärbung.

Auch menschliche Leucocyten aus einem keimarmen Abszeß zeigten dasselbe Verhalten.

Wir sehen also, daß die Ausschaltung der Atmung keine Schädigung der anderen Zellfunktionen zur Folge hat. Die zur Aufrechterhaltung dieser Funktionen nötige Energie dürfte aus dem Spaltungsstoffwechsel stammen. Während normalerweise bei Anwesenheit von O_2 — wie in der Blutbahn — der Leucocyt seinen Energiebedarf aus Atmung und Glykolyse bestreitet, kann er bei Ausschaltung der Atmung oder bei O_2-Mangel allein auf Kosten der Glykolyse leben. Wir sind also berechtigt, von einer *fakultativen Anoxybiose der Leucocyten* zu sprechen.

Daß die Phagocytose wohl eine von der Zellatmung unabhängige, jedoch trotzdem an das Leben der Zelle und das Erhaltensein wenigstens einer energieliefernden Reaktion gebundene Funktion ist, können

---

[1]) *Landois-Rosemann*, Lehrb. d. Physiol., 18. Aufl., 1923, S. 55.
[2]) *Leo Loeb*, Pflügers Arch. **131**, 465, 1910.
[3]) *H. J. Hamburger*, Abderhaldens Arbeitsmethod. **4**, 4, 3.
[4]) *W. Fleischmann*, Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. **210**, 612, 1925.

wir durch Vergiftung der Zelle mit NaF beweisen. Das Natriumfluorid wirkt hemmend auf zahlreiche Fermente der Zelle, so auf Gärungsvorgänge im allgemeinen [*Buchner* und *Hahn*[1])], speziell auf die Glykolyse im Muskel [*Embden*, *Abraham* und *Lange*[2])] und im Blute [*Bürger*[3])]. Im Blute werden auch die Oxydationen durch Zusatz von NaF gehemmt [*Arthus* und *Huber*[4])]. Nun wissen wir aus den Untersuchungen *Hamburgers*[5]), der die Wirkung der Natriumhalogenide auf die Phagocytose untersuchte, daß NaF bereits in einer Konzentration von 0,3 Proz. die Phagocytose vollständig hemmt.

Versuche mit Exsudatleucocyten bei Zusatz von NaF (1 : 100) ergaben: Atmung und Glykolyse gehemmt ($Q_{O_2} = 0$, $Q_M^{N_2} = 0$), Phagocytose und amöboide Bewegung fehlen vollständig. Bei Färbung mit Neutralrot waren zahlreiche Zellen diffus hellrosa gefärbt; viele Kerne rot gefärbt; nur vereinzelte Zellen zeigten Granulafärbung.

Wir sehen aus diesen Befunden, daß bei gleichzeitiger Hemmung von Atmung und Glykolyse das phagocytäre Vermögen und die amöboide Beweglichkeit verschwinden und gleichzeitig jene Form der Färbung mit Neutralrot auftritt, welche wir als Ausdruck der Nekrobiose anzusehen gewohnt sind. Die anoxybiotische Funktion der Leucocyten darf daher nicht als ein Beweis dafür angesehen werden, daß die Phagocytose vom Leben der Zelle unabhängig und rein von physikalischen Faktoren bestimmt ist, wie es *Rhumbler*[6]) und *Friedemann* und *Schönfeld*[7]) annehmen.

Auch durch Narkotica können wir bei den sogenannten Strukturwirkungsstärken [*Warburg*[8])] Atmung und Glykolyse [*Minami*[9])] hemmen. Auch hier kennen wir aus den Untersuchungen *Hamburgers* die hemmende Wirkung der Narkotica auf die Phagocytose. Doch liegen hierbei durch Veränderungen der lipoidlöslichen Zellbestandteile bedingte komplizierte Verhältnisse vor.

Wir möchten nur die für unsere Fragestellung interessante Tatsache erwähnen, daß kleinste Konzentrationen lipoidlöslicher Substanzen das phagocytäre Vermögen der Zellen erhöhen und daß bei

---

[1]) *E. Buchner* und *M. Hahn*, Die Zymasegärung, S. 184. München 1903.
[2]) *G. Embden*, *A. Abraham* und *H. Lange*, Zeitschr. f. phys. Chem. **136**, 308, 1924.
[3]) *M. Bürger*, Zeitschr. f. exper. Med. **31**, 1, 1923.
[4]) *M. Arthus* und *Huber*, Arch. d. phys. (5) **4**, 651, 1892.
[5]) *H. J. Hamburger*, Phys.-chem. Untersuchungen über Phagocyten, S. 71. Wiesbaden 1912.
[6]) *L. Rhumbler*, Ergebn. d. Phys. **14**, 1914.
[7]) *U. Friedemann* und *A. Schönfeld*, diese Zeitschr. **80**, 312, 1917.
[8]) *O. Warburg*, Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. **158**, 19, 1914.
[9]) *S. Minami*, diese Zeitschr. **142**, 334, 1923.

diesen Konzentrationen (z. B. Chloroform 1 : 50000) nach Versuchen von *Buytendyk*[1]) die O_2-Aufnahme beträchtlich erhöht ist.

Es ist auch denkbar, daß die von *Asher*[2]) und seiner Schule entdeckte Beziehung zwischen Schilddrüse und phagocytärem Vermögen im Zusammenhang mit der Beeinflussung des Stoffwechsels aller Körperzellen durch die Schilddrüse steht, doch müssen hier erst sorgfältige Versuche Klarheit schaffen.

Vom Standpunkt der allgemeinen Physiologie betrachtet, erscheint es bemerkenswert, daß die Protoplasmabewegung der Leucocyten vom Sauerstoff anscheinend unabhängiger ist als die einzelliger im Wasser lebender Tiere, der Amöben, zu deren Bewegung Sauerstoff notwendig ist, wie wir aus den Untersuchungen *Kühnes*[3]) wissen. Dieser Unterschied in den Lebensbedingungen ist verständlich, wenn wir uns vor Augen halten, wie verschieden das Milieu der Amöben von dem der Leucocyten in bezug auf Sauerstoff- und Glucoseversorgung ist.

Die Anoxybiose der Leucocyten kann ferner als Beweis für die von *Rossbach*[4]) postulierte funktionelle Differenzierung des Protoplasmas angesehen werden. *Rossbach* kommt in seiner ausführlichen Studie über die Funktionen der Infusorien und deren Empfindlichkeit gegen Schädigungen zu dem Schluß: „Es ist nur unter dieser Voraussetzung (einer funktionellen Differenzierung des Protoplasmas) zu verstehen, wie man einzelne Funktionen (der einzelligen Organismen) brach legen kann bei Fortbestehen der anderen". Das Fortbestehen von Glykolyse und amöboider Bewegung bei Brachlegung der Atmung zwingen uns, dieselbe Differenzierung auch im Protoplasma der Leucocyten anzunehmen.

In dieser Differenzierbarkeit der Funktionen einer Zelle liegt vielleicht die Möglichkeit der Entstehung bösartiger Tumoren begründet, wenn wir mit *Warburg*[5]) annehmen, daß es einzelne Zellen in den Geweben gibt, die neben ihrer Zellatmung noch ihre embryonale glykolytische Wirksamkeit haben, und daß diese Zellen bei Sauerstoffmangel oder Schädigung der Atmung auf Kosten ihrer Glykolyse weiter leben und wachsen.

Daß speziell Leucocyten in vitro malignen Charakter annehmen können, ist durch die Versuche *Carrels*[6]) und *A. Fischers*[7]) bewiesen. Durch diese Versuche erscheint es wahrscheinlich, daß die Leucocyten die Ursprungs-

---

[1]) *F. J. J. Buytendyk*, zitiert nach *Hamburger*, l. c., S. 168.

[2]) *L. Asher*, Klin. Wochenschr. **3**, 308, 1924; vgl. auch *W. Fleischmann*, Pflügers Arch. **215**, 273, 1926.

[3]) *W. Kühne*, Untersuchungen über Protoplasma, S. 53. Leipzig 1864.

[4]) *Rossbach*, Verh. phys. med. Ges. Würzburg **2**, 179, 1872.

[5]) *O. Warburg*, Stoffwechsel der Tumoren, S. 135.

[6]) *A. Carrel*, C. r. soc. biol. **92**, 584; **93**, 1491, 1925.

[7]) *A. Fischer*, Klin. Wochenschr. **6**, 433, 1927.

zellen des Roussarkoms sind. Es wurde schon erwähnt, daß die große anaerobe Gärung der Leucocyten in diesem Zusammenhang interessant ist. Nun ist durch den Beweis eines anaeroben Lebens der Leucocyten und der anaeroben Kultur von Roussarkom in vitro durch *Warburgs* Mitarbeiter *Wind*[1]) eine neue Ähnlichkeit mit dem Roussarkom gegeben.

Es ist wahrscheinlich, daß die Anoxybiose der Leucocyten nicht nur in vitro zu demonstrieren ist, sondern auch im Körper bei pathologischen Prozessen eine Rolle spielt. In Abszeßhöhlen und Exsudaten herrscht sicher oft O_2-Mangel, und gerade hier ist die Funktionsfähigkeit der Leucocyten von Wichtigkeit für die Abwehrtätigkeit. *Bakker*[2]) hat darauf hingewiesen, daß hier der Spaltungsstoffwechsel Bedeutung haben kann. Wir dürfen nach unseren Befunden annehmen, daß der *Leucocyt auch bei vollständigem Sauerstoffmangel seine volle phagocytäre Leistungsfähigkeit im Abwehrkampfe entfalten kann.*

Zusammenfassung.

1. Bei vollkommener Ausschaltung der Zellatmung durch m/200 HCN ist Glykolyse, Phagocytose und amöboide Beweglichkeit bei Leucocyten des Blutes wie bei Exsudatleucocyten vollkommen erhalten. Wir können daher von einer fakultativen Anoxybiose der Leucocyten sprechen.

2. Bei der Anoxybiose der Leucocyten sind amöboide Bewegung und phagocytäres Vermögen an die Energielieferung durch den Zerfall der Kohlehydrate in Milchsäure gebunden; denn bei Ausschaltung von Atmung und Glykolyse durch NaF verschwinden diese Funktionen.

3. Dies ist mit Rücksicht auf die Tatsache bemerkenswert, daß auch bei der Muskelkontraktion die Reaktion Kohlehydrat-Milchsäure die Energiequelle bildet.

4. Die Brachlegung der Zellatmung bei Fortbestehen der anderen Funktionen wird als ein Beweis für die funktionelle Differenzierung des Protoplasmas nach *Rossbach* angesehen.

5. Die Anoxybiose weist auf eine Verwandtschaft mit dem Roussarkom im Sinne der Untersuchungen von *Warburg* und *A. Fischer* hin.

6. Es ist denkbar, daß in Abszessen und Exsudaten die anoxybiotische Tätigkeit der Leucocyten von Wichtigkeit ist.

---

[1]) *F. Wind,* Klin. Wochenschr. **5**, 30, 1926.
[2]) *A. Bakker*, a. a. O.

Über den Fermentgehalt des menschlichen Gehirns.

Von

T. Takasaka.

(Aus der chemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses in Berlin.)

(Eingegangen am 18. März 1927.)

Die Stoffwechselvorgänge im Gehirn sind in letzter Zeit mehrfach Gegenstand eingehender Untersuchung gewesen.

Besonders intensiv hat man sich mit dem Zuckerstoffwechsel im Gehirn beschäftigt; es sei nur auf die Arbeiten von *Hirschberg* und *Winterstein*[1]), *Asher* und *Takahashi*[2]), *Warburg* und seinen Mitarbeitern[3]), *Loebel*[4]), *Wohlgemuth* und *Nakamura*[5]) und auf die soeben erschienene Mitteilung von *Krontowski*[6]) hingewiesen. Aus ihnen geht übereinstimmend hervor, daß der Kohlehydratstoffwechsel im Gehirn ein sehr reger ist.

Es unterliegt nun keinem Zweifel, daß die Stoffwechseltätigkeit der Nervenzelle nicht bloß auf Kohlehydrate beschränkt ist. Sicherlich erstreckt sie sich noch nach den verschiedensten anderen Richtungen; doch sind unsere Erfahrungen hierüber äußerst spärlich. Am ehesten dürfte man einen Einblick in die Verhältnisse bekommen, wenn man weiß, über welche Kräfte die Hirn- und Nervenzelle verfügt, um sich an dem Stoffwechsel zu betätigen. Ich bin deshalb der Anregung von Herrn Prof. *Wohlgemuth* gern gefolgt und habe das menschliche Gehirn, zum Teil auch die Hypophyse und von peripheren Nerven den Ischiadicus auf seinen Fermentbestand untersucht; daneben auch das Gehirn des Meerschweinchens, da dieses Tier sich durch seinen hohen Fermentgehalt besonders auszeichnet.

---

[1]) *Hirschberg* und *Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **100**, 185, 1917; **101**, 248, 1918; **108**, 27, 1919.

[2]) *Asher* und *Takahashi*, diese Zeitschr. **159**, 351, 1925.

[3]) *Warburg*, *Posener* und *Negelein*, ebendaselbst **152**, 331, 1924.

[4]) *Loebel*, ebendaselbst **161**, 219, 1925.

[5]) *Wohlgemuth* und *Nakamura*, ebendaselbst **175**, 233, 1926.

[6]) *A. A. Krontowski*, ebendaselbst **182**, 1, 1927.

I.

Im Hinblick darauf, daß das Zentralnervensystem neben Eiweiß in der Hauptsache Fett und Lipoide enthält, untersuchte ich es zuerst auf den *Gehalt an Lipase.*

Ich bediente mich dabei der Tributyrinmethode von *Rona* und *Michaelis.*

Vorausgeschickt sei, daß ich für alle meine Untersuchungen Gehirn von Leichen verwandte, bei denen der Eintritt des Todes nicht länger als 24 bis 30 Stunden zurücklag. Das Gehirn wurde von der Pia mater und den peripheren Blutgefäßen sorgfältig befreit, in kleine Teile zerschnitten und zur Entfernung der Blutreste mit Wasser abgespült, bis sich das Spülwasser nicht mehr rot verfärbte. Dann wurde die graue Substanz von der weißen getrennt, mit der Schere noch weiter zerkleinert und im Mörser zu einem homogenen Brei verrieben. 1 Teil dieses Gehirnbreies wurde mit 2 Teilen 1proz. NaCl-Lösung gründlichst verrieben, etwa ½ Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann scharf abzentrifugiert. Von diesem Extrakt wurden 2,0 ccm zum Versuch verwandt. Als Pufferlösung diente ein Gemisch von m/3 primärem und m/3 sekundärem Phosphat von der Reaktion $p_H = 7{,}6$; 1,0 ccm hiervon diente zur Pufferung von 30 ccm frisch hergestellter gesättigter Tributyrinlösung. Da wider Erwarten der Effekt nur ein schwacher war, wurde die Tropfenzählung über 2 Stunden ausgedehnt. Das Resultat meiner Untersuchungen teile ich in Tabelle I mit; sie gibt nur einen kleinen Teil der von mir angestellten Versuche wieder.

Tabelle I.

Extrakt aus	Versuch I Tributyrinspaltung Proz.	Versuch II Tributyrinspaltung Proz.	Versuch III Tributyrinspaltung Proz.	Versuch IV Tributyrinspaltung Proz.
weißer Substanz . . .	60	56	55	55
grauer Substanz . . .	53	46	47	48
Hypophyse	54	56	—	—
Nerv. ischiadicus . . .	56	45	42	48
Meerschweinchenhirn .	80	83	—	—

Aus der Tabelle I geht hervor, daß die Tributyrinspaltung in allen Fällen nur eine schwache ist; die weiße Substanz wirkt stets etwas kräftiger als die graue. Ebenso schwach wirksam sind die Extrakte aus Hypophyse und Nerv. ischiadicus, wesentlich wirksamer waren die Extrakte aus Meerschweinchenhirn.

Man konnte nun daran denken, daß bei ausgedehnterer Extraktion das Resultat ein besseres sein würde. Wir haben deshalb den Hirnbrei mit Kochsalzlösung 24 Stunden stehenlassen, sind aber dabei keineswegs zu besseren Ergebnissen gekommen.

Alsdann prüfte ich das Verhalten der Lipase gegenüber Chinin und Atoxyl, um festzustellen, ob wir es im Gehirn mit einer anderen Lipase als der des Serums zu tun haben.

Die Versuche wurden so ausgeführt, daß 2 ccm Extrakt, mit 10 mg Chinin bzw. 10 mg Atoxyl versetzt, zunächst 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann mit 30 ccm gepufferter Tributyrinlösung gemischt wurden. Auch hier war die Versuchsdauer 2 Stunden. Das Resultat teile ich in Tabelle II mit.

Tabelle II.

Extrakt aus	Versuch I Tributyrinspaltung Proz.	Versuch II Tributyrinspaltung Proz.	Versuch III Tributyrinspaltung Proz.
Kontrolle	55	55	55
weißer Substanz + 10 mg Chinin . .	54	52	53
+ 10 mg Atoxyl . .	52	49	51
Kontrolle	47	48	47
grauer Substanz + 10 mg Chinin . .	45	46	45
+ 10 mg Atoxyl . .	45	40	39
Kontrolle	56	45	42
Nerv. ischiadicus + 10 mg Chinin . .	53	42	38
+ 10 mg Atoxyl . .	48	38	37

Aus den Versuchen geht somit hervor, daß die Lipase des zentralen und peripheren Nervensystems sowohl chinin- wie atoxylresistent ist. Da nun die Serumlipase des Menschen gegenüber beiden Giften außerordentlich empfindlich ist, so besagt dieser Befund, daß der Gehalt der Extrakte an Lipase nicht zurückgeführt werden darf auf die Gegenwart von Blutbestandteilen, sondern daß er tatsächlich aus dem Zellmaterial der Nervensubstanz stammt.

Endlich habe ich mich noch bemüht, festzustellen, ob die Gehirnsubstanz imstande ist, Lecithin zu spalten, bin aber nur zu negativen Ergebnissen gelangt.

II.

Von *kohlehydratspaltenden Fermenten* hat man bisher im Gehirn ein glykolytisches gefunden, bzw. ein Milchsäure bildendes bzw. ein Acetaldehyd bildendes; nur das letztere ist im menschlichen Gehirn festgestellt worden, die anderen teils im Gehirn von Fröschen, teils von Ratten.

Daß ein *diastatisches Ferment* im Gehirn vorkommt, ist gleichfalls bekannt; doch hatte man bisher keine Kenntnis von den Quantitäten, in denen es im Gehirn anzutreffen ist.

Diese Lücke habe ich zunächst auszufüllen gesucht, indem ich mir aus menschlichem Gehirn in der oben beschriebenen Weise Extrakte herstellte und in ihnen die Diastase mit der Methode von *Wohlgemuth* bestimmte. So untersuchte ich neben weißer und grauer Substanz getrennt noch Hypophyse, Nerv. ischiadicus und Meerschweinchenhirn. Die Resultate gebe ich in Tabelle III wieder.

Tabelle III.

Extrakt aus	Versuch I $d_{24h}^{38^0}$	Versuch II $d_{24h}^{38^0}$	Versuch III $d_{24h}^{38^0}$	Versuch IV $d_{24h}^{38^0}$	Versuch V $d_{24h}^{38^0}$
weißer Substanz	4	8	4	8	8
grauer Substanz	16	16	8	16	16
Hypophyse	125	62	62	62	62
Nerv. ischiadicus	32	32	32	32	32
Meerschweinchenhirn . .	62,5	125	—	—	—

Auch die Diastasemengen des menschlichen Gehirns sind nicht erheblich; doch enthält hier die weiße Substanz weniger als die graue. Das periphere Nervensystem scheint reicher an Diastase zu sein als das zentrale; wesentlich höher ist der Diastasegehalt der Hypophyse, er übertrifft den des Gehirns um das Vier- bis Achtfache. Das Meerschweinchenhirn enthält wesentlich größere Mengen an Diastase als das menschliche.

Alsdann prüfte ich das Menschenhirn auf die Gegenwart von Polysaccharide spaltenden Fermenten, und zwar untersuchte ich, ob sich im Gehirn ein Fructose und ein Lactose spaltendes Ferment nachweisen ließe. Aber sämtliche Versuche ergaben ein negatives Resultat, ganz gleichgültig, ob ich mit Extrakten aus Gehirn oder mit Gehirnsubstanz selbst arbeitete.

Daß ein *glykolytisches Ferment* im tierischen Gehirn sich findet, ist bewiesen einerseits durch die Versuche von *Hirschberg* und *Winterstein*, die das Verschwinden von Zucker aus der das Froschrückenmark umspülenden Flüssigkeit festgestellt hatten, andererseits durch *Warburg* und seine Mitarbeiter, die die Bildung von Milchsäure in Schnitten von Rattenhirn zum Maßstab gewählt hatten. Über Milchsäurebildung durch menschliche Hirnsubstanz liegen noch keine Erfahrungen vor, wenn wir von dem oxydativen Zuckerabbau durch Menschenhirn absehen, über den *Wohlgemuth* und *Nakamura* vor kurzem berichtet haben.

Ich untersuchte nun, ob und in welchem Umfange das menschliche Gehirn imstande ist, aus verschiedenen Kohlehydraten Milchsäure zu bilden.

Als Versuchsanordnung wählte ich folgende:

Menschliches Gehirn, von Leichen möglichst frisch entnommen, wurde von der Pia mater und den peripheren Blutgefäßen befreit, abgespült, in kleine Stücke geschnitten und in der Reibeschale zu einem homogenen Brei verrieben. 10 g dieses Breies wurden versetzt mit 45,0 ccm 0,9proz. NaCl-Lösung + 5,0 ccm einer Pufferlösung, hergestellt nach *Soerensen*, aus m/5 primärem Phosphat und m/5 sekundärem Phosphat von der Reaktion $p_H = 7,0$, und 0,2 g Optochin. bas. als Desinfizienz. Diese Portion diente als Kontrolle. In der gleichen Weise wurden drei weitere Proben angestellt

von genau der gleichen Zusammensetzung unter Zugabe von 0,5 g Glucose bzw. 0,5 g Galaktose bzw. 0,5 g Lävulose, die vorher in einem aliquoten Teil der erforderlichen 0,9proz. NaCl-Lösung gelöst worden waren. Dann kamen sämtliche vier Portionen auf 8 Stunden in den Brutschrank und blieben bis zum nächsten Tage im Eisschrank stehen. Die weitere Verarbeitung geschah dann so, daß der Gesamtinhalt der Kölbchen scharf zentrifugiert, 30 ccm des Zentrifugats aufgekocht, mit 4,0 ccm 10proz. wolframsaurer Natriumlösung und 6,0 ccm $^2/_3$ n H_2SO_4 versetzt, umgeschüttelt und nach 10 Minuten langem Stehen abfiltriert wurden. 30 ccm des vollkommen eiweißfreien Filtrats wurden in einem Meßkölbchen von 50 ccm zur Entzuckerung nach *Salkowski-Clausen* mit Kupfersulfat und Kalkmilch versetzt, 30 Minuten bei Zimmertemperatur öfters geschüttelt, bis zur Marke aufgefüllt und dann das Filtrat nach *Molisch* mit α-Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure auf Zuckerfreiheit geprüft. Mit Ausnahme von Fructose und Lävulose, bisweilen auch von Lactose gelang die Entzuckerung sofort. War Zucker im Filtrat noch vorhanden, so wurde ein aliquoter Teil des Filtrats noch einmal mit Kupfersulfat und Kalkmilch behandelt.

Danach wurde in 10 ccm Filtrat die Milchsäure nach der Methode von *Fürth-Charnass* unter Beobachtung der von *Hirsch-Kaufmann* und von *Meyerhof* gegebenen Vorschriften quantitativ bestimmt. Die nachfolgend mitgeteilten Zahlen sind Mittelwerte aus gut übereinstimmenden Doppelanalysen.

Kontrolle. 10 ccm Filtrat enthielten 0,697 mg Milchsäure, mithin in 10 g Gehirnbrei 7,74 mg Milchsäure.

Portion I (Glucose). 10 ccm Filtrat enthielten 1,305 mg, mithin in 10 g Gehirnbrei 14,5 mg Milchsäure.

Portion II (Galaktose). 10 ccm Filtrat enthielten 1,22 mg; mithin in 10 g Gehirnbrei 13,58 mg Milchsäure.

Portion III (Lävulose). 10 ccm Filtrat enthielten 1,53 mg; mithin in 10 g Gehirnbrei 17,0 mg Milchsäure.

Dieser Versuch ergibt, daß das menschliche Gehirn, ohne besonderen Zusatz von Kohlehydraten aus eigenen disponiblen Substanzen Milchsäure bildet (Kontrolle). Bei Gegenwart von Kohlehydraten tritt

Tabelle IV.

	Versuch II mg Milchsäure		Versuch III mg Milchsäure		Versuch IV mg Milchsäure	
	in 10 ccm Filtrat	in 10 g Gehirn	in 10 ccm Filtrat	in 10 g Gehirn	in 10 ccm Filtrat	in 10 g Gehirn
Kontrolle	0,337	3,75	0,67	7,45	0,535	5,95
Glucose	0,958	10,65	1,264	14,05	0,900	10,00
Galaktose	1,318	14,65	1,21	13,45	0,810	9,00
Lävulose	1,219	13,55	1,37	15,30	1,125	12,39
Saccharose	1,197	13,30	1,18	13,11	0,967	10,50
Lactose	1,037	11,50	—	—	0,743	8,26
Glykogen	—	—	1,139	12,65	0,765	8,50
Monohexosephosphorsäure	0,684	7,49	—	—	0,653	7,25

eine erhebliche Mehrproduktion ein, die am größten in der Portion mit Lävulose ist.

Derartige Versuche habe ich mit diesen und anderen Kohlehydraten eine ganze Reihe angestellt. Der Kürze halber seien sie in Tabelle IV zusammengestellt.

Aus sämtlichen Versuchen geht hervor, daß menschliches Gehirn imstande ist, aus den verschiedensten Zuckern Milchsäure zu bilden. Von Monosacchariden lieferte Lävulose in allen Versuchen bis auf einen am meisten Milchsäure, nur einmal ist die Wirkung der Galaktose am höchsten. Nach den Beobachtungen von *Loebel* am Rattenhirn, denen zufolge Galaktose schneller glykolysiert wird als Glykose, konnte man ein ähnliches Verhalten auch beim Menschenhirn erwarten. Es hat sich aber nur in einem Falle (Versuch 2) die Galaktose als besserer Milchsäurebildner erwiesen als die Glucose; sonst bewegen sich die Milchsäurewerte aus Galaktose immer etwas unter der Glucose. Überraschend ist die Milchsäurebildung aus Lactose und Fructose, obwohl sich im Menschenhirn kein diese Zucker in ihre Komponenten zerlegendes Ferment nachweisen ließ. Das weist darauf hin, daß Polysaccharide direkt zu Milchsäure abgebaut werden können, ohne vorher gespalten zu werden. Glykogen hat in unseren Versuchen stets geringere Mengen Milchsäure geliefert als Glucose. Monohexosephosphorsäure wird gleichfalls vom Menschenhirn, aber nur in geringem Umfange zu Milchsäure abgebaut.

III.

Von eiweißspaltenden Fermenten wurde das menschliche Gehirn auf die Gegenwart von *Autolyse*, *Gelatinase*, *peptolytischem Ferment* und *Nuclease* untersucht.

Was zunächst die *Autolyse* anbetrifft, so war bei der allgemeinen Verbreitung dieses Ferments zu erwarten, daß es auch im Menschenhirn vorhanden ist. Mich interessierte besonders, ob in den Mengenverhältnissen ein Unterschied zwischen grauer und weißer Substanz besteht.

Die Versuche wurden so ausgeführt, daß 30 g Menschenhirn mit 90 ccm 0,9proz. Kochsalzlösung zu einem homogenen Brei in der Reibeschale verrieben, ein aliquoter Teil entnommen und in ihm sofort der lösliche Stickstoff bestimmt wurde. Die Hauptmenge wurde unter Toluol im Brutschrank gehalten und in 24stündigen Intervallen das Fortschreiten der Autolyse durch Ermittlung des in Lösung gegangenen Stickstoffs verfolgt. Die Enteiweißung geschah mit kolloidaler Eisenlösung nach vorherigem Erwärmen. In der gleichen Weise wurde mit weißer und grauer Substanz gesondert verfahren, unter Innehaltung der gleichen Flüssigkeitsverhältnisse. Auch mit peripherer Nervensubstanz wurden mehrere Versuche unter den gleichen Bedingungen angestellt. Das Resultat der Versuche gebe ich in Tabelle V wieder. Die dort aufgeführten Zahlen entsprechen dem in 10,0 ccm Brei gelösten N in Milligrammen.

Tabelle V.

	Gehirn		Versuch I				Versuch II	
			weiße Substanz		graue Substanz		weiße Substanz	
		Diff.		Diff.		Diff.		Diff.
Sofort	3,808	—	3,474	—	5,600	—	3,052	—
Nach 24 Stdn. . . .	5,488	1,680	4,888	1,416	8,400	2,800	4,592	1,540
„ 48 „ . . .	6,272	0,784	5,656	0,668	9,856	1,456	5,320	0,728
„ 72 „ . . .	6,664	0,392	—	—	—	—	—	—

	Versuch II		Nervus ischiadicus			
	graue Subtanz		Versuch I		Versuch II	
		Diff.		Diff.		Diff.
Sofort	4,928	—	1,568	—	1,540	—
Nach 24 Stdn.	7,280	2,352	2,240	0,672	2,352	0,812
„ 48 „	8,512	1,232	2,660	0,420	2,800	0,448
„ 72 „	—	—	—	—	—	—

Aus den mitgeteilten Zahlen geht hervor, daß im menschlichen Gehirn sich ein schwach wirksames autolytisches Ferment findet. Dasselbe ist in der grauen Substanz in größerer Menge enthalten als in der weißen Substanz. Auch im peripheren Nerven findet es sich, hier ist es aber noch schwächer als in der weißen Substanz.

Sodann untersuchte ich das Gehirn auf die Gegenwart von *Gelatinase*.

Den hierfür erforderliche Extrakt stellte ich mir so her, daß ich 1 Teil Substanz mit 3 Teilen physiologischer Kochsalzlösung verrieb, einige Zeit bei Zimmertemperatur stehen ließ und dann scharf abzentrifugierte. Den Extrakt ließ ich auf 5 Proz. Chloroformgelatine wirken, deren Reaktion $p_H = 7{,}0$ betrug, und zwar in Form eines Reihenversuchs. Die Reihen kamen auf 24 Stunden in den Brutschrank, wurden dann 30 Minuten lang in Eiswasser gestellt und dann ermittelt, welche kleinste Extraktmenge noch imstande war, 1,0 ccm Gelatine zu verflüssigen. Aus ihr wurde die Gelatinasemenge für 1,0 ccm Extrakt berechnet. Außer Menschenhirn untersuchte ich noch Meerschweinchenhirn. Die ermittelten Werte sind in Tabelle VI aufgeführt.

Tabelle VI.

	Menschenhirn	Weiße Substanz	Graue Substanz	Meerschweinchen-hirn
Versuch I	8	8	2	8
„ II	4	8	1	8
„ III	4	8	2	8

Hiernach ist das menschliche Gehirn in geringem Maße befähigt, Gelatine zu verflüssigen, und zwar die weiße Substanz in stärkerem Maße als die graue. Nach dem Ausfall der Autolyseversuche hatte ich ein Überwiegen der grauen Substanz erwartet, es ergab sich aber in

allen Fällen das Gegenteil. Das Meerschweinchenhirn enthält etwa die gleiche Menge an Gelatinase. Im peripheren Nerven und in der Hypophyse konnte keine Gelatinase nachgewiesen werden.

Von *peptolytischen Fermenten* fahndete ich nach einem Glycyltryptophan spaltenden und einem Glycyltyrosin spaltenden Ferment. Der Nachweis des letzteren gelang nie, dagegen der des ersteren in allen Fällen auf folgende Weise:

3 g Menschenhirn wurden mit der dreifachen Menge physiologischer Kochsalzlösung in der Reibeschale verrieben und nach einigem Stehen bei Zimmertemperatur scharf abzentrifugiert. 2 ccm des überstehenden Extrakts wurden mit etwa 0,02 g Glycyltryptophan, gelöst in 1,0 ccm NaCl-Lösung, versetzt und unter Toluol 24 Stunden im Brutschrank belassen. Danach wurde durch Zusatz von Bromwasser geprüft, ob Tryptophan aus dem Dipeptid abgespalten worden ist. Sämtliche Versuche gaben eine starke Violettfärbung.

Es ist somit im Menschenhirn ein Glycyltryptophan spaltendes Ferment vorhanden.

Endlich wurde geprüft, ob menschliches Gehirn auch eine *Nuclease* enthält. Bei dem Reichtum an Ganglienzellen, besonders in der grauen Substanz, konnte man das Ferment hier erwarten. Die Versuchsanordnung war folgende:

Aus der Gehirnsubstanz wurde ein Extrakt in der üblichen Weise (1 Teil Gehirn + 2 Teile physiologischer NaCl-Lösung) bereitet und 18 ccm dieses Extrakts versetzt mit 5,0 ccm einer 2proz. Lösung von hefenucleinsaurem Natrium; zur Kontrolle die gleiche Extraktmenge mit 5 ccm H_2O. Beide Portionen kamen unter Toluol in den Brutschrank. Nach 24 Stunden wurden aus beiden Kölbchen je 5,0 ccm Inhalt entnommen und in ihm nach *Bell-Doisy* die freie Phosphorsäure kolorimetrisch bestimmt, nach weiteren 24 Stunden abermals.

Auf diese Weise untersuchte ich graue Substanz getrennt von der weißen, daneben auch periphere Nervensubstanz. Das Resultat dieser Versuche teilte ich in Tabelle VII mit. Die hier aufgeführten Zahlen bedeuten Milligramm freie Phosphorsäure in 100 ccm Extrakt.

Tabelle VII.

		Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle
Graue Substanz nach	24^h	38,10	19,13	37,50	18,87	44,64	19,24
	48	38,86	19,66	38,55	19,14	45,63	19,97
Weiße Substanz nach	24	25,21	17,98	25,39	18,14	36,27	18,81
	48	28,57	18,63	28,21	18,47	37,20	19,16
Nerv. ischiadicus	24	13,08	8,22	13,11	8,00	15,37	8,52

Aus allen Versuchen geht hervor, daß das Gehirn imstande ist, aus Nucleinsäure Phosphorsäure abzuspalten. Besonders wirksam ist die graue Substanz, aber auch die weiße enthält Nuclease in nicht geringer

Menge. Meist ist die Maximalwirkung schon nach 24 Stunden erreicht. Die peripheren Nerven enthalten nur kleine Mengen an Nuclease.

Zum Schluß prüfte ich noch, ob das Gehirn eine *Phenolase* enthält.

Da sich im Blute schon Phenolase findet, wurde bei der Verarbeitung des Gehirns alle Sorgfalt darauf verwandt, möglichst blutfreie Extrakte zu erhalten.

Die Herstellung geschah in der oben beschriebenen Weise. Mit einem solchen Extrakt stellte ich zuerst einen qualitativen Versuch an, um mich zu orientieren, ob eine starke Wirkung zu erwarten war. Zunächst ließ ich den Extrakt auf das leicht angreifbare Adrenalin einwirken. Die Versuche fielen aber stets negativ aus, während die Adrenalinkontrolle im Reagenzglas nach 1 bis 2 Stunden stets die typische Rosafärbung zeigte. Ebensowenig wurde Brenzcatechin vom Extrakt angegriffen. Die Versuche deuteten im Gegenteil eher darauf hin, daß die Gehirnextrakte eine hemmende Wirkung auf die Autooxydation dieser Phenolderivate ausübt.

Ich habe mich nun bemüht, diese hemmende Wirkung genau zu messen, und bin so vorgegangen, daß ich eine Reihe von Reagenzgläsern mit absteigenden Mengen des Extrakts beschickte in fortlaufender Progression und zu jedem Gläschen 2 Tropfen der offizinellen Adrenalinlösung (1 : 1000) zugab. Dann kam die Reihe auf 24 Stunden in den Brutschrank, und nach Ablauf der Frist wurde festgestellt, bis zu welchem Gläschen eine Hemmung zu erkennen war. Ebenso wurden Versuche mit Brenzcatechin angestellt unter Verwendung von je 1,0 ccm einer 1proz. Lösung. Für Adrenalin ergab sich eine Hemmung noch bei 0,25 bzw. 0,125 ccm Extrakt, bei Brenzcatechin war sogar noch eine Hemmung mit 0,0625 ccm Extrakt deutlich zu erkennen. Auch Extrakte aus dem Nerv. ischiadicus besitzen diese hemmende Kraft.

Es findet sich somit in der Gehirn- und Nervensubstanz keine Phenolase. Beide Substanzen haben im Gegenteil die Fähigkeit, Adrenalin und Brenzkatechin vor der Zersetzung zu schützen.

Zusammenfassung.

Im menschlichen Gehirn findet sich eine schwach wirksame Lipase, die gegen Chinin und Atoxyl resistent ist.

Von Kohlehydrat spaltenden Fermenten wurde eine schwach wirksame Diastase gefunden und ein glykolytisches Ferment, das aus Polysacchariden ebenso Milchsäure bildet wie aus Monosacchariden. Von diesen erwies sich als bester Milchsäurebildner die Lävulose, während die Milchsäuremengen aus Glykogen und Glucose stets niedriger waren.

Neben Autolyse konnte eine Gelatinase, ein peptolytisches Ferment und Nuclease nachgewiesen werden.

Die Fermentverteilung im Gehirn ist eine unregelmäßige. Die graue Substanz übertrifft die weiße in ihrem Gehalt an Diastase, autolytischem Ferment und Nuclease, während die Lipase und Gelatinase sich in größerer Menge in der weißen Substanz finden.

Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. I.[1])

Von

J. K. Parnas und Wł. Mozołowski.

[Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lwów (Lemberg).]

(Eingegangen am 19. März 1927.)

Mit 14 Abbildungen im Text.

I.

Die Erforschung der chemischen Vorgänge im Muskel, die in den letzten zwei Jahrzehnten den Umsatz der Kohlehydrate in seinem Zusammenhang mit der Energetik der Muskelarbeit so weitgehend aufgeklärt hat, ließ die einfachen stickstoffhaltigen Verbindungen des Muskelgewebes und ihre Umsetzungen bei Arbeit und Zustandsänderungen dieses Gewebes fast unbeachtet. Einzig das Kreatin hat — infolge der Annahme über den Zusammenhang dieses Stoffes mit dem Muskeltonus — erhöhte Beachtung gefunden; wie wenig Bedeutung man dagegen dem Harnstoff und dem Ammoniak und ihrem Zusammenhang mit den chemischen Vorgängen im Muskel beilegt, zeigt der Umstand, daß diesen Stoffen in neuen, ausführlichen Darstellungen der Muskelchemie nur wenige Zeilen gewidmet sind und auch diese nichts Sicheres bringen[2]).

Die neuere Literatur des Gegenstandes ist auch sehr spärlich. Wir werden Arbeiten, deren Ergebnisse mit den unseren zu vergleichen sein

---

[1]) Der *Ella-Plotz-Sachs-Foundation*, deren Spende die Ausführung dieser Arbeit ermöglicht hat, möchten wir an dieser Stelle unseren Dank aussprechen. Die hier mitgeteilten Untersuchungen wurden in den Sitzungen der Wissenschaftlichen Gesellschaft in Lemberg am 31. Januar 1927 und am 21. Februar 1927 und zusammenfassend in einem Vortrag in der *Biologischen Gesellschaft* in Wien am 14. März 1927 vorgetragen.

[2]) *G. Embden* in Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie 8 (1), 459, 1925; *O. v. Fürth* in Handb. d. Biochem. 8, 80, 1925; 4, 334/335, 1925; *Theophile Cahn*, Ann. d. Physiol. 2, 646, 1926.

werden, später besprechen; hier wollen wir nur diejenigen erwähnen, in welchen eine zuverlässige Methodik für die Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak angewandt wurde.

Nachdem *Marshall*[1]) die Urease zur Harnstoffbestimmung im Muskel zuerst verwendet hatte, hat *J. B. Sumner*[2]) in Muskeln von Katzen und Meerschweinchen Bestimmungen von Harnstoff und Ammoniak nebeneinander ausgeführt. Er findet in *zerkleinerter* Muskulatur der Katze 10 bis 15 mg-Proz. Ammoniakstickstoff, 24 bis 32,7 mg für die Summe des Harnstoffs und Ammoniakstickstoffs.

R. Hoagland und *C. M. Mansfield*[3]) haben dann in einer besonders sorgfältigen, unter aseptischen Kautelen durchgeführten Arbeit an Ochsen das postmortale Verhalten von Harnstoff im Muskelgewebe untersucht. Obwohl sie den Ammoniakgehalt untersucht haben, führen sie keine Werte für diesen Stoff, sondern nur den Harnstoffgehalt der Muskeln an. Es ist bemerkenswert, daß in den Versuchen dieser Autoren der Harnstoffgehalt der Muskulatur bei einer Inkubation von bis 41 Tagen bei 37° konstant bleibt, während in anderen Versuchen von *Hoagland, McBryde* und *Powick*[4]), in welchen Harnstoff nicht bestimmt wurde, der Ammoniakgehalt der Ochsenmuskulatur innerhalb von 101 Tagen bei 37° von 8,7 auf 62,9 mg-Proz. anwächst.

Gad Andersen[5]) hat im Jahre 1919 über den Gehalt der Muskulatur an Harnstoff und Ammoniak ganz andere Werte veröffentlicht als seine Vorgänger. *Sumner* hatte den Ammoniakgehalt der Muskeln sehr viel höher gefunden als den des Blutes, der von *Gad Andersen* zu 0,25 bis 0,5 mg-Proz. angenommen wird. *Gad Andersen* zeigt, im Gegensatz zu *Sumner*, daß man den Ammoniakgehalt des Blutes und der Muskulatur annähernd gleich findet, wenn man den Ammoniakgehalt des Muskels durch Zerreiben mit Alkohol bei — 20° fixiert: daß im Muskel nach dem Tode eine Zersetzung von Harnstoff zu Ammoniak stattfindet, während im Blute weder Ammoniakbildung noch Harnstoffschwund erfolgt. *Die Summe von Harnstoff und Ammoniak bleibt nach Gad Andersen im Froschmuskel, Rattenmuskel und Hundemuskel konstant und der des Blutes gleich.* Wir werden auf die Untersuchungen von *Gad Andersen* noch zurückkommen; vorwegnehmend möchten wir schon jetzt bemerken, daß wir sie in den meisten Punkten *nicht* bestätigen konnten und zu ganz anderen Ergebnissen gelangt sind.

Von ganz anderer Seite haben sich *O Meyerhof, K Lohmann* und *R. Meier*[6]) mit der Ammoniak- und Harnstoffbildung im Warmblütermuskel beschäftigt. Im Gegensatz zum isolierten Froschmuskel, in dem sich eine Ammoniakbildung bei Arbeit, Erholung, Anoxybiose und Starre

---

[1]) *Marshall*, Journ. of biol. Chem. **15**, 493, 1913; *Marshall* und *Davies*, ebendaselbst **18**, 53, 1914.

[2]) *Sumner*, ebendaselbst **27**, 95, 1916.

[3]) *R. Hoagland* und *C. M. Mansfield*, ebendaselbst **31**, 487, 1917.

[4]) *Hoagland, McBryde* und *Powick*, U. S. Dept. Agric. Bull. 1917, S. 433; zitiert nach *R. Hoagland* und *C. M. Mansfield*, Journ. of biol. Chem. **31**, 487, 1917.

[5]) *Gad Andersen*, Journ. of biol. Chem. **39**, 267, 1919.

[6]) *O. Meyerhof, K. Lohmann* und *R. Meier*, diese Zeitschr. **157**, 459, 1925.

nicht nachweisen ließ[1]), zeigt in den Versuchen dieser Forscher das Rattenzwerchfell in Ringerphosphatlösung bei guter Sauerstoffversorgung eine bedeutende Ammoniakbildung, wenn die Nährflüssigkeit keinen Traubenzucker und keine Zwischenglieder des Kohlehydratstoffwechsels (Milchsäure, Brenztraubensäure) enthält; besonders aber, wenn die Muskulatur von Hungerratten stammt. Anoxybiose verringert die Ammoniakbildung, wenn auch nicht so stark wie Zuckerangebot.

Die Werte, welche *Meyerhof*, *Lohmann* und *Meier* für den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung in der Muskulatur des Rattenzwerchfells bei 37° und bei Abwesenheit hemmender Faktoren gefunden haben (S. 484), sind hier in diejenigen Einheiten umgerechnet, die in dieser Arbeit verwendet werden sollen.

Tabelle I.

(Nach *Meyerhof*, *Lohmann* und *Meier*.)

Versuch Nr.	Anfangsgehalt des Muskels mg-Proz. NH_3-N	Versuchsdauer	Gebildet mg-Proz. NH_3-N	Gebildet mg-Proz. NH_3-N pro Stunde
1	4,5	4h30'	8,7	1,94
2	4,5	6	3,7	0,618
3	4,12	5 30	5,9	1,05
4	3,86	5	6,5	1,3
5	5	6	4,6	0,77
6	4,24	5 30	9,1	1,65
9	2,75	2 30	2,95	1,28

Vergleicht man diese Werte für die Ammoniakbildung in Muskeln mit der Ammoniakbildung in anderen Geweben, wie sie unter sehr ähnlichen Bedingungen von *Warburg*, *Negelein* und *Posener*[2]) bestimmt wurde, so fällt es auf, daß die intensivste Ammoniakbildung in den Muskeln derjenigen der am schwächsten ammoniakbildenden Gewebe (abgesehen von der Schilddrüse) entspricht. Es bilden nämlich bei 37,5, in Ringer-Glucoselösung und $p_H = 7,66$:

Submaxillaris *)	Leber †)	Pankreas *)	Thymus †)	Hoden †)	Graue Hirnsubstanz †)	Retina †)
1,88	4,38	6,88	19,4	14,37	87,5	75 mg-Proz.

*) Kaninchen. — †) Ratte.

Ammoniak-N in der Stunde, während Rattencarcinom 50 bis 62 und Hühnerembryo (fünftägig) 35 mg-Proz. NH_3—N pro Stunde erzeugen[3]).

[1]) Abgesehen von den oben angeführten Ergebnissen *Gad Andersens*: einen Zuwachs von *Aminostickstoff* haben *J. Parnas* und *R. Wagner* (diese Zeitschr. **61**, 416, 1914) sowie *O. Meyerhof* (Pflügers Arch. **204**, 328, 1924) in wärmestarren und chloroformstarren Froschmuskeln nicht finden können. Auf die Untersuchung von *Lee* und *Tashiro* (Amer. Journ. of Physiol. **61**, 244, 1922) werden wir später zurückkommen (s. S. 423).

[2]) Diese Zeitschr. **152**, 335, 1924.

[3]) Nach *Warburg*, *Negelein* und *Posener*.

Wir berücksichtigen hier die Literatur der sogenannten autolytischen Vorgänge nicht, bei welchen Ammoniakbildung im Muskel beobachtet wurde. Es ist freilich nicht leicht, diejenigen Vorgänge, die man als Fortsetzung der chemischen Lebensprozesse betrachtet, von denjenigen begrifflich abzugrenzen, die man als Wirkung der Zellfermente nach Auflösung der sowohl die vitale Ordnung als den Zellstoffwechsel bedingenden Struktur ansieht: in der Tat fließen beide Gruppen von Vorgängen ineinander. Im einzelnen Falle wird jedoch die Unterscheidung möglich sein: so wird man die im Rindfleisch bei 37° vor sich gehende Bildung von Ammoniak und Aminosäuren[1]), oder die Ammoniakbildung im Rattenmuskel[2]), die erst nach Verlauf mehrerer Stunden nach Zerkleinerung des Muskelgewebes ansetzt, als autolytische Vorgänge ansehen; dagegen die oxydative Ammoniakbildung in frischen Rattendiaphragmen, wie sie von *Meyerhof*, *Lohmann* und *Meier* beschrieben wird, als Fortsetzung der Stoffwechselvorgänge des Gewebes auffassen können.

II. Die traumatische Ammoniakbildung.

1. Die Grundversuche.

Den Ausgangspunkt unserer Untersuchungen über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel bildete die Beobachtung, daß sich beim Zerreiben eines Froschmuskels mit wenig Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung innerhalb einer Minute große Ammoniakmengen bilden, und daß diese Ammoniakbildung ausbleibt, wenn der Muskel nicht mit Wasser, sondern mit derselben schwach alkalischen Boratlösung zerrieben wird, die wir zur Hemmung der Ammoniakbildung im Blute verwenden.

1. Der Grundversuch ist einfach, klar und leicht reproduzierbar. *Man präpariert einen Gastrocnemius eines frisch getöteten Frosches, wägt ihn auf der Torsionswage und zerreibt ihn mit 3 ccm Wasser sehr schnell in einem rauhen Glasmörser mit Quarzsand: das Zerreiben dauert 15 Sekunden, dann lasse man noch bis 2 Minuten stehen. Die Wasserstoffionenkonzentration des Breies beträgt* $p_H = 7{,}3$[3]). *Man bringt die Masse in den Kolben des Destillationsapparats, in dem sich schon 10 ccm einer kalt gesättigten ammoniakfreien Boratlösung befindet. Man erhält nach der Destillation, die 3 bis 4 Minuten dauert, eine*

---

[1]) *Hoagland, McBryde* und *Powick*, zitiert nach Journ. of biol. Chem. **81**, 487, 1917.

[2]) *Popoviciu*, diese Zeitschr. **170**, 408, 1926 (*Über Bedingungen der autolytischen Ammoniakbildung in den Geweben*).

[3]) Mit der Chinhydronelektrode nach *Mozolowski* und *Parnas* gemessen.

Ammoniakmenge, die dem Gehalt von 5 mg NH_3-N in 100 g Muskel entspricht. Wiederholte Destillationen geben keine weiteren Ammoniakmengen.

2. *Man wiederholt denselben Versuch mit dem zweiten, symmetrischen Gastrocnemius, zerreibt ihn aber nicht mit Wasser, sondern mit 3 ccm der oben erwähnten Boraxlösung; die Wasserstoffionenkonzentration entspricht jetzt $p_H = 9{,}35$; nach 15 Sekunden bringt man die Masse in den Kolben und destilliert. Man findet nur 0,4 bis 0,7 mg-Proz. Ammoniakstickstoff, die Werte schwanken je nach der Sorgfältigkeit der Präparierung und Geschwindigkeit, mit welcher das Zerreiben mit Borat erfolgt.*

Man kann beide Versuche an weiteren Muskeln der Froschschenkel mit dem gleichen Resultat wiederholen.

Der naheliegende Einwand, daß sich das Ammoniak aus der alkalischen Lösung ($p_H = 9{,}3$) während des Zerreibens verflüchtigt hat, läßt sich leicht entkräften. Wenn man zur Boratlösung im Mörser 0,01 mg Ammoniakstickstoff hinzufügt, 30 Sekunden unter ähnlicher Behandlung wie beim Zerreiben des Muskels stehenläßt und dann destilliert, so findet man über 95 Proz. wieder[1]). Wenn man die mit Wasser zerriebenen Muskeln nach 2 Minuten mit Borat versetzt, nach weiteren 30 Sekunden in den Kolben spült und destilliert, so findet man dieselben Ammoniakmengen, wie wenn man ohne vorherige Alkalisierung im Mörser in den Kolben spült.

Wenn man die Destillation der mit Borat zerriebenen Muskeln wiederholt, so findet man nach Minuten und nach Stunden kein Ammoniak mehr.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß in Skelettmuskeln unter dem Einfluß der mechanischen Zerstörung eine sehr schnell verlaufende Ammoniakbildung vor sich geht: wir wollen sie als **traumatische Ammoniakbildung** *bezeichnen. Die traumatische Ammoniakbildung läßt sich verhindern, wenn das Gewebe im Moment der Verletzung mit einer alkalischen*

---

[1]) Als Beispiel sei folgender Kontrollversuch angeführt: Es wurden bestimmte Volumina von Standardlösungen aus der Bürette abgemessen: einmal in den Kolben des Destillationsapparats und nach Zufließenlassen der Boraxlösung wie bei der Blutdestillation, bei geschlossenem Apparat, im Vakuum mit Dampf destilliert; dann die gleiche Menge in den Mörser abgemessen, mit Boraxlösung und Quarzsand versetzt, 30 Sekunden lang wie bei der Muskelzerstörung verrieben, in das Kölbchen (s. Abb. 1) gespült und destilliert. Wenn man die ersten Werte als Standardwerte betrachtet, so wurde gefunden:

Standard mg	Wie bei Muskelverarbeitung behandelt Proz.
0,002	100
0,006	102
0,010	105
0,030	97

Flüssigkeit durchtränkt wird; *die alkalische Reaktion* **verhindert aber auch auf die Dauer** *die Ammoniakbildung*.

Die traumatische Ammoniakbildung ist eine den quergestreiften Muskeln aller Wirbeltiere allgemeine Erscheinung: wir haben sie bis jetzt bei Amphibien, Reptilien, Fischen, Vögeln, Säugern — auch an Menschenmuskeln — beobachtet.

Aus der Hemmung der traumatischen Ammoniakbildung durch alkalische Boratlösung ergibt sich die Möglichkeit, den Ammoniakgehalt des Muskelgewebes in jedem Zustande, im Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung zu bestimmen. Wir haben auf dieser Grundlage eine Methode ausgearbeitet, welche die Bestimmung des Ammoniakgehalts in etwa 0,5 g Muskel ebenso leicht und schnell ausführen läßt, wie die Ammoniakbestimmung im Blute nach *Parnas* und *Heller*[1]). Mittels dieser Methode haben wir den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung, sowie die traumatische Ammoniakbildung in Muskeln verschiedener Tierklassen und unter verschiedenen Bedingungen studiert. Die vorliegende Arbeit soll die Grundtatsachen in einem Umriß darstellen, dessen Vertiefung weiteren Arbeiten vorbehalten bleiben muß. Der Betrag der traumatischen Ammoniakanhäufung stellt die obere Grenze der physiologischen Schwankungen des Ammoniakgehalts dar, *und alle diese Schwankungen mußten unbemerkt bleiben, solange die Erscheinung der traumatischen Ammoniakbildung unbekannt war und solange man sie nicht zu verhindern wußte.* Die Verhältnisse liegen hier ähnlich, wie bei der traumatischen Milchsäurebildung, deren Entdeckung und Beherrschung durch *Fletcher* und *Hopkins* erst die Möglichkeit schuf, Milchsäure im Muskelgewebe zu bestimmen und die Funktion dieser Substanz im Chemismus der Muskeltätigkeit aufzuklären.

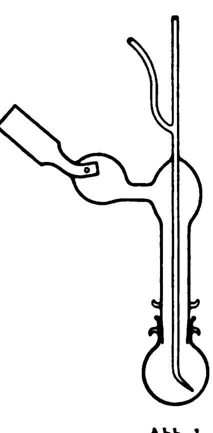
2. *Methodik.*

Da die Festlegung des chemischen Zustandes des Muskels bei der Bestimmung seines Ammoniakgehalts von größter Bedeutung ist. so muß die Zerreibung des Gewebes schnell erfolgen, und zwar so, daß die alkalische Boratlösung möglichst schnell in die verletzten Fasern dringen kann. Wir arbeiten folgendermaßen: ein Glasmörser von 25 ccm Inhalt, bei einem Durchmesser von 4,5 cm, mit rauher Innenfläche, und ein ebenfalls rauhes Glaspistill, das zu einem viel größeren Mörser gehört, werden so gewählt, daß die Reibfläche des Pistills und des Mörsers aneinanderpassen. Man bringt etwa 5 ccm Boratlösung in den Mörser und etwa 0,5 bis 1 g ausgeglühten Quarzsand. Der Muskel wird auf der Torsionswage von *Hartmann* und *Braun* mit Hilfe von

[1]) Diese Zeitschr. 152, 1, 1924.

passend angefertigten Häkchen aus Aluminiumdraht abgewogen und in die Boratlösung gebracht: es ist auch zweckmäßig, ihn vorher in Quarzsand zu tauchen. Man kann dann mit wenigen kurzen Bewegungen, unter Vermeidung des Schwenkens der Flüssigkeitsoberfläche, den Muskel fein zerreiben.

Die Bestimmung des Ammoniaks geschieht genau so, wie sie am Blute in diesem Laboratorium ausgeführt wird, in der Apparatur von *Parnas* und *Heller*, in der endgültigen Form, wie sie von *Parnas* und *Klisiecki*[1]) beschrieben wird. Da indessen das Einbringen des Gewebsbreies in den für Blut bestimmten Destillationskolben — durch das Dampfeinleitungsrohr — unmöglich ist, weil sich die Verjüngung dieses Rohres mit Quarz und Muskelfaser verstopft, so verwenden wir ein neues Modell des Destillationskolbens, dessen untere Kugel, welche die zu destillierende Masse aufnimmt, als kurzhalsiges Kölbchen angeschliffen und abnehmbar ist[2]). Eine Bestimmung dauert, einschließlich der kolorimetrischen Bestimmung, etwa 10 Minuten. Die Wasserdampfdestillation im Vakuum[3]) kann meistens ohne Zusatz von Paraffin geschehen, da der Schaum bald zusammenfällt.


Abb. 1.

Zur Alkalisierung verwenden wir jetzt eine bei 12° gesättigte Lösung von reinem Borax, welche durch Kochen ammoniakfrei gemacht wird. Ihre Reaktion entspricht einem $p_H = 9{,}35$ ($t = 18^0$), und sie bedarf für 1 ccm 1,9 ccm n/10 HCl, um auf $p_H = 7{,}3$ gebracht zu werden[4]).

---

[1]) *Parnas* und *Klisiecki*, diese Zeitschr. **178**, 224, 1926.

[2]) Hergestellt von *Robert Goetze*, Leipzig.

[3]) Während einer Demonstration dieser Methode am XII. Physiologenkongreß in Stockholm stellte Prof. *S. R. Benedict* die Frage, ob nicht bei der Wasserdampfdestillation im Vakuum lokale Temperaturerhöhungen, etwa an der Mündung des Dampfeinleitungsrohres, stattfinden könnten. Wir haben die Temperatur während der Destillation thermoelektrisch mit einem Konstantan-Kupferelement und einem schnellen Drehspulgalvanometer gemessen. Wenn die Destillation, wie gewöhnlich, bei 26 mm Druck erfolgt, so ist die Temperatur im Kolben 30 bis 35°, wenn sich im Kolben 10 ccm Flüssigkeit befinden. Fühlt sich der Kolben warm an und zeigt das Manometer 30 mm, so steigt die Temperatur bis 39°. Größere Schwankungen haben wir unter den Bedingungen der Destillation nicht gesehen, und die Temperatur ist an der Mündung des Einleitungsrohres dieselbe wie an anderen Stellen. Der Dampf kühlt sich schon im langen Einleitungsrohr durch Ausdehnung stark ab.

[4]) Dies ist die Reaktion des mit Wasser zerriebenen Muskelgewebes.

Die Bestimmung des Ammoniaks geschah, genau wie bei Bestimmungen im Blute, mittels des *Nessler*schen Reagens und kolorimetrischer Messung im Kolorimeter von *Wolff*. Der maximale Fehler der Bestimmung — als Ganzes genommen — beträgt nach Versuchen an ebenso behandelten Standardlösungen $\pm$ 5%.

Zur Fixierung des Zustandes haben wir manchmal die Muskeln in flüssige Luft eingetaucht und sogar stundenlang aufbewahrt; man kann die gefrorenen Muskeln in einem trockenen Raume auch sehr gut auf der Torsionswage wägen und sehr bequem in kleinere Stücke spalten[1]). Das Gefrieren der Muskeln in der Nähe von 0° bedingt, wie wir zeigen werden, traumatische Ammoniakbildung, auch wenn die Temperatur nicht wieder zum Auftauen des Gewebes steigt.

3. Der Ammoniakgehalt und die traumatische Ammoniakbildung im frischen normalen Muskel.

Die Tabellen II und III geben die Werte für den Ammoniakgehalt frischer normaler Muskeln sowie die traumatische Ammoniakanhäufung in denselben.

Die Zahlen der Kolonne 4 (NH_3-N-Gehalt) geben den Ammoniakgehalt (in Milligrammen für 100 g frisches Gewebe), der gefunden wird, wenn das Gewebe mit Boratlösung zerrieben wird.

Die Zahlen der Kolonne 5 (NH_3-N nach Zerreiben mit H_2O) geben den Ammoniakgehalt an, der gefunden wird, wenn das Gewebe mit Wasser zerrieben 2 Minuten lang bei Zimmertemperatur belassen und dann mit Borat versetzt wird.

Die Zahlen der Kolonne 6 (traumatische NH_3-Bildung) geben die Differenz der beiden Werte für zusammengehörige Muskeln aus Kolonne 5 und 4 in Milligrammen NH_3-N für 100 g Gewebe an.

Die Muskeln werden nicht immer genau bezeichnet, sondern zum Teil nur die Gruppe, zu der sie gehören, da für genaue Bestimmung meistens keine Zeit war.

Die Werte für den Ammoniakgehalt des frischen Muskels schwanken, für den Froschmuskel, in den Grenzen zwischen 0,4 und 1,1 mg-Proz., wobei die meisten Werte um 0,8 mg-Proz. liegen, der Durchschnittswert 0,66 mg-Proz. beträgt. Wir betrachten die Versuche vom 26. Januar als die besten: hier sind die Muskeln Tieren von bestimmter Temperatur entnommen, die Tiere sehr schnell getötet und präpariert und die Muskeln unter Anwendung von flüssiger Luft verarbeitet worden. Wir sind auf Grund dieser Versuche der Ansicht, daß der Ammoniak-

[1]) Der Sauerstoffabrik „*Gaz*“ in Lwow-Persenkówka, die uns während dieser Arbeit unentgeltlich mit flüssiger Luft versorgte, möchten wir an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Tabelle II. **Ammoniakgehalt und -bildung in Skelettmuskeln der Frösche.**

1	2	3	4	5	6	7
Datum	Muskel	Gewicht mg	NH_3-N-Gehalt mg-Proz.	NH_3-N-Gehalt nach Zerreiben mit H_2O mg-Proz.	Traumatische NH_3-N-Bildung mg-Proz.	
14. I.		220	0,63			Rana esculenta
		282		4,75		
		240		4,16	3,53	
		225		5,32		
15. I.	Tibialis	174	0,65			„ „
	„	160		4,37	3,62	
		234	0,94			
		298		5,66	4,72	
	Adductor	227		4,73		
17. I.	Tibialis	255	1,0	5,4	4,4	„ „
18. I.	Gastrocnemius	238		5,66		„ „
	„	242		5,40		Mit 0,6proz. NaCl zerrieben
19. I.	Tibialis	236	0,92			Rana esculenta
24. I.	Gastrocnemius	519	0,80			„ „ , Muskel auf — 180° abgekühlt
	„	520	0,48			
25. I.	„	344	0,67			ebenso
	Adductor	311	0,84			„
	„	390	0,82			„
	Gastrocnemius	432	0,39			„
	„	540	0,55			„
	„	540	0,51			„
26. I.	„	438	0,43			Rana esculenta bei + 1° gehalten, Muskeln mit flüssiger Luft auf — 180° abgekühlt
	„	430	0,43			
	Adductor	439		4,0	3,57	
26. I.	Gastrocnemius	433	0,44			Rana esculenta bei 12° gehalten, Muskel auf — 180° abgekühlt
	„	433		4,6	4,16	
26. I.	„	376	0,52			Rana esculenta bei 20° gehalten, Muskel auf — 180° abgekühlt
	„	375		4,8	4,28	
1. II.	Adductor	394	0,76			
	„	385		5,91	5,1	Rana esculenta
1. II.	Gastrocnemius	394	0,59	6,3	5,7	„ „
3. II.	„	522	0,77			„ temporaria
	Tibialis	400		5,00	4,23	
8. II.	Gastrocnemius	431	0,68			„ esculenta
	Tibialis	335		4,84	4,16	
8. II.	Adductor	419	0,95			„ „
	„	319		6,95	6,0	
	Gastrocnemius	394	0,96			
	Tibialis	198		5,54	4,58	
9. II.	Gastrocnemius	548	1,10			Rana temporaria, Bestimmungen an einem amputiert. Unterschenkel ausgeführt
	Tibialis	371		5,09	4,00	
10. II.	Gastrocnemius	778	0,6			Rana esculenta
	Tibialis	414		6,5		
	Semimembran.	810	0,78		5,9	
	„	600		7,5	6,7	

Tabelle III. Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung in Skelettmuskeln verschiedener Tierklassen und Arten.

Datum	Muskel	Gewicht mg	NH_3-N-Gehalt mg-Proz.	NH_3-N-Gehalt nach Zerreiben mit H_2O mg-Proz.	Traumatische NH_3-N-Bildung mg-Proz.	
			Fische: Rotfeder (*Scardinius erythrophthalmus*)			
18. II.	Rückenmuskel	488	1,92			In gut durchlüftetem Aquarium gehalten. Durch Gehirnzerstörung getötet, geschuppt, Muskel sehr schnell nach Myomeren geschnitten
		540		8,32	6,40	
		420	1,96			
		460	1,74			
		500		8,15	6,21	
20. II.	"	741	1,43			In flüssiger Luft abgekühlt
		657	1,58			
			Amphibien: Frösche (*Rana esculenta* und *temporaria*).			
	Schenkel- und Wadenmuskel		0,66	5,36	4,70	Durchschnittswerte aus Tabelle II
			Reptilien: Sumpfschildkröte (*Emys europaea*).			
14. II.	Schultermuskel	512	0,78			Großes Exemplar, seit zwei Jahren gehalten, im Sommer gut genährt. Entblutet
		520		3,4	2,6	
		503		2,8	2,0	
	Hinterbeinm.	240	0,44			
			Vögel: Taube (*Columba livia domestica*).			
25. II.	Schenkelmuskel	508	0,8			Entblutet, 6 Min. nach Köpfung analysiert
		463		3,97	3,1	
			Säuger: Maus.			
14. II.	Hinterbeinmuskel	314	1,26			In CO_2 erstickt, entblutet, abgekühlt, 5 bis 6 Min. nach Einbringen in CO_2 analysiert
		340		5,3	4,0	
		312	1,1			
		216		3,9	2,8	
14. II.	"	550	1,3			
16. II.	"	450	0,72			
		490		3,48		
17. II.	"	384	1,07			
		320		4,87	3,80	
		354	1,03			
		388		4,5	3,42	
18. II.	"	317	0,97			
		274	0,73			
			Kaninchen.			
22. II.	Wadenmuskel	472	0,3			Entblutet, in flüssiger Luft gekühlt, 10 Min. nach Tötung analysiert
		550		4,82	4,5	
		204		4,18	3,9	
		320	0,46			
			Mensch.			
25. I.	M. iliocostalis lumborum	503	0,2			Mann, bei Operation entnommen, nach 11 Min. analysiert
				2,64	2,4	
24. I.	Rectus abdom.	500	0,25	1,4	1,15	Mann, Ca. ventriculi, 6 Min. n. Entn. analysiert
			Katze.			
1. III.	Muskel von der Vorderpfote	494	0,92			Katze, ♂, in Enthirnungsstarre, 5 bzw. 12 Min. nach d. Muskelentnahme
		486		3,18	2,26	

N-Gehalt, welcher dem Ruhezustande des Froschmuskels entspricht, 0,4 bis 0,5 mg für 100 g beträgt. Er entspricht dem Ammoniakgehalt des Froschblutes.

Wie wir später zeigen werden, erfolgt in verschiedenen Muskeln eine verschieden starke, manchmal sehr bedeutende Ammoniakbildung, welche die Bestimmung des Ruhewertes erschwert. Beim Frosch ist diese Ammoniakbildung bei einer Temperatur von 15° noch sehr langsam, und die Bestimmung des Anfangswertes wird nur durch die traumatische Ammoniakbildung kompliziert. Wenn diese Einwirkung durch Anwendung flüssiger Luft behoben wird, so gelangt man zu Werten, welche wahrscheinlich richtig sind. Die Werte, welche man erhält, wenn die Muskeln bei Zimmertemperatur mit Borat verrieben wurden, liegen um etwa 0,2 mg-Proz. höher.

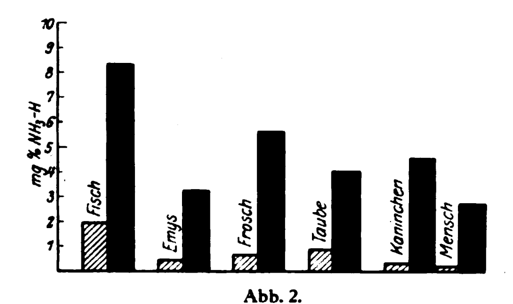


Abb. 2.

Ammoniakgehalt (NH_3-N mg-Proz.) in Skelettmuskeln verschiedener Tierarten.

Schraffierte Felder: Nach Zerreiben mit Borat, also aktueller Ammoniakgehalt. Schwarze Felder: Nach Zerreiben mit Wasser, also Summe des aktuellen Ammoniakgehaltes und der traumatischen Ammoniakbildung.

Daß im untersuchten Fischmuskel viel höhere Werte gefunden wurden als beim Frosch, entspricht wahrscheinlich einer tatsächlichen Differenz im Ammoniakgehalt. Beim Fisch ist die traumatische Ammoniakbildung viel größer als beim Frosch und als bei allen anderen untersuchten Tierarten; bei Anwendung flüssiger Luft ist sie jedoch ausgeschaltet, und man findet dennoch 1,4 bis 1,6 mg-Proz. NH_3-N als Ruhewert.

Bei der Schildkröte und der Taube finden wir ähnliche Werte wie beim Frosch: der Wert für den Taubenmuskel dürfte zu hoch sein, da hier schon wenige Minuten eine bedeutende postmortale Zunahme des Ammoniakgehalts bedingen; dasselbe dürfte auch für die Maus gelten. Bemerkenswert niedrige Werte haben wir für den Muskel des Menschen und des Kaninchens gefunden; es liegt nahe, diese niedrigen Werte mit dem niedrigen Ammoniakgehalt des Blutes dieser Arten in Zusammenhang zu bringen.

Vergleicht man die hier mitgeteilten Werte für den Ammoniakgehalt des Muskelgewebes mit den bis jetzt in der Literatur mitgeteilten, so ergibt sich, daß einzig *Gad Andersen*[1]) zu Werten gelangt ist, welche mit unseren übereinstimmen, während *alle* anderen weit davon abweichen. *Gad Andersen* hat mittels eines Verfahrens, welches der Fixierung des Milchsäuregehalts im Muskel nach *Fletcher* und *Hopkins* durch sehr kalten Alkohol nachgebildet ist, den Ammoniakgehalt der Froschmuskeln zu 0,8 mg-Proz. NH_3-N, den des Rattenmuskels und des Hundemuskels zu 0,4 mg-Proz. bestimmt[2]).

Die Werte für den Ammoniakgehalt der Diaphragmamuskulatur der Ratte, die *Meyerhof*, *Lohmann* und *Meier* angegeben haben, sind viel höher, sie liegen zwischen 2,75 und 5 mg-Proz., mit 4,1 mg-Proz. als Durchschnittswert. *Meyerhof*, *Lohmann* und *Meier*[3]) fixieren den Muskel durch Zerdrücken unter n/10 Salzsäure; wir haben uns überzeugt, daß man auf diese Weise Werte ähnlicher Größe erhält, wie durch Zerdrücken unter Borat. An einem Froschgastrocnemius erhielten wir auf diese Weise einen Ammoniakstickstoffgehalt von 0,7 mg-Proz. Wir können uns den großen Unterschied zwischen dem Rattendiaphragma und allen von uns untersuchten Muskeln nicht erklären; auch die postmortale Ammoniakbildung gibt darüber keine Rechenschaft.

Die von *Sumner*[4]) angegebenen Werte für den Ammoniakgehalt der Katzen- und Meerschweinchenmuskeln betragen 10,4 bis 13 mg-Proz. NH_3-N für Katzenmuskel, 13 bis 15 mg-Proz. für Meerschweinchen; man kann sie aus der traumatischen Ammoniakbildung allein nicht erklären, auch aus der postmortalen nicht, denn diese müßte durch das zur Ammoniakaustreibung zugesetzte Kaliumcarbonat verhindert werden. Wir haben für Katzenmuskel viel geringere traumatische Ammoniakwerte gefunden, als der von *Sumner* für zerhackte Katzenmuskulatur angegebene, und selbst nach fünfstündigem Aufenthalt bei 39^0 enthielten die Katzenmuskeln nur 8 mg-Proz. NH_3-N.

Die *traumatische Ammoniakbildung* ist, wie ein Blick auf die Tabellen II und III zeigt, eine allen Klassen der Wirbeltiere und allen Arten von Skelettmuskeln allgemeine Erscheinung. Ihr Betrag ist so groß — für die Durchschnittswerte des Froschmuskels 700 Proz., für Kaninchenmuskeln 1000 Proz., für Fischmuskeln 450 Proz. der Anfangswerte —, daß sie sehr weit außerhalb der individuellen Schwankungen des Ruhewertes liegt.

---

[1]) *Gad Andersen*, Journ. of biol. Chem. **39**, 270, 1919.

[2]) *Gad Andersen* gibt für jede Muskelart nur eine Zahl an.

[3]) *O. Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier*, diese Zeitschr. **157**, 459, 1925.

[4]) *J. Sumner*, Journ. of biol Chem. **27**, 95, 1916.



Tabelle IV.

	Gewebe	Gewicht mg	NH_3-N-Gehalt nach Zerreiben mit Borat	NH_3-N-Gehalt traumatisch	
11. II. Rana temporaria	Magen	249	1,53		
	"	250		2,0	
	Leber	398	1,95		
	"	370		2,4	
27. I. Rana esculenta	"	296	0,86		
	"	292		1,27	
	"	259		1,52	
	"	223	1,01		
	Niere	144	5,92		
	Hoden	44	3,7		unreif
3. II. Rana temporaria	"	235	0,99		
	"	235		1,22	reif
	Niere	90	5,2		
	"	90		5,2	
	Magen	230	0,97		
4. II. Rana esculenta	"	260		1,5	

Die hohe traumatische Ammoniakbildung ist eine *besondere Eigenschaft des quergestreiften Skelettmuskels.* Dies geht aus der Tabelle IV hervor, welche den Ammoniakgehalt und die traumatische Ammoniakbildung für andere Gewebe enthält. Sie sind in der gleichen Weise bestimmt worden, wie für den Muskel.

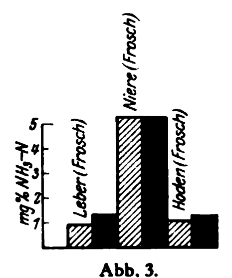


Abb. 3. Schraffierte Felder: NH_3-N nach Zerreiben der Organe mit Borat. Schwarze Felder: Nach Zerreiben mit Wasser.

Bei manchen Organen mit hohem Ammoniakgehalt, wie die Niere, erfolgt nach Zerreiben mit Wasser keine weitere Ammoniakbildung, bei der Leber und dem Hoden ist sie gering, 20 bis 25 Proz. des Anfangswertes. Man könnte auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß bei diesen Geweben die alkalische Reaktion die traumatische Ammoniakbildung nicht verhindert, und daß auch der Boratwert die traumatische Anhäufung darstellt. Da die alkalische Boratlösung sowohl die Ammoniakbildung im Blute als auch im Muskel verhindert, möchten wir diese Vermutung, für deren Prüfung wir vorläufig keinen Weg sehen, nicht für wahrscheinlich halten, und wir nehmen den Unterschied im Verhalten des Skelettmuskels einerseits, von Drüsengewebe andererseits als tatsächlich bestehend an.

Interessante Unterschiede ergeben sich beim Vergleich der traumatischen Ammoniakbildung im Skelettmuskel einerseits, in glatten Muskeln und Herzmuskeln andererseits. Werte für diese Muskeln sind in Tabelle V zusammengestellt.

Tabelle V.

	Tierart	Organ	Analysierte Menge mg	NH_3-N nach Zerreiben mit Borat mg-Proz.	NH_3-N nach Zerreiben mit Wasser mg-Proz.	
27. II.	Rana temporaria	Magen	230	0,97		
4. II.	Rana esculenta	„	260		1,5	
11. II.	Rana temporaria	„	249	1,53		
		„	250		2,0	
14. II.	Emys europaea	„	1574		2,6	Fundus
		„	1870	0,94		13 bzw. 16 Min. nach Tötung
25. II.	Columba livia	„	481	0,71		Muskelmagen
		„	487		1,35	
14. II.	Emys europaea	Herz (Kammer)	1050	0,4		
		„	1575		0,6	
25. II.	Columba livia	„	515	1,36		25′
		„	473		4,2	33′
22. II.	Lepus cuniculus	„	477	1,38		5′
		„	468		1,67	9′

Wir sehen im Herzmuskel von Schildkröte und Kaninchen eine nur sehr geringe traumatische Ammoniakbildung, dagegen einen bedeutenden Effekt im Herzmuskel der Taube. In der mächtigen Muskulatur des Magens der Schildkröte finden wir traumatische Ammoniakbildung, die 180 Proz. des Anfangswertes beträgt, dagegen nur 30 Proz. beim Frosch und 90 Proz. bei der Taube.



Abb. 4.
Schraffierte Felder: Ammoniakgehalt nach Zerreiben mit Borat. Schwarze Felder: nach Zerreiben mit Wasser.

Die traumatische Ammoniakbildung ist also auch in der glatten Muskulatur und im Herzen vorhanden, aber meistens in geringerem Betrage als in der Skelettmuskulatur.

Die Erscheinung der traumatischen Ammoniakbildung beweist, daß im Muskelgewebe ein metastabiles System enthalten ist, welches auf Verletzung der Gewebsstruktur Ammoniak abspaltet. Die Natur und Funktion dieses Systems wird weiterhin zu erörtern sein.

4. *Der Verlauf der traumatischen Ammoniakbildung.*

In den angeführten Versuchen wird die traumatische Ammoniakbildung nach 2 Minuten langem Zerreiben bestimmt; diese Zeit wurde auf Grund von Versuchen gewählt, welche zeigten, daß nach ihrem Ablauf die schnelle Ammoniakbildung zu Ende gekommen ist.

Tabelle VI. $t = 17°$.

Muskelart	Gewicht mg	Zeitdauer von Beginn des Zerreibens bis zur Hemmung der NH_3-Bildung Sekunden	Ammoniak-N mg-Proz.	
Tibialis	550	0	0,72	1. II. R. esculenta
Gastrocnemius . .	448	16	1,54	
" . .	450	30	2,38	
Schenkelmuskel . .	500	45	2,88	
" . .	520	60	4,23	
" . .	383	90	5,23	
" . .	494	120	4,6	

28. Januar. Zwei symmetrische Gastrocnemien wurden mit je 5 ccm Wasser bei Zimmertemperatur 30 Sekunden lang zerrieben: der eine wurde nach 2 Minuten, der andere nach 120 Minuten analysiert. Der NH_3-Gehalt des ersten entspricht 6,2 mg-Proz., der des zweiten 7,14 mg-Proz. Der Ammoniakgehalt des Muskelbreies wurde hier, wie in anderen ähnlichen Versuchen, durch Eingießen in Boratlösung festgelegt.

In einem anderen Versuch wurde ein Frosch getötet, die Schenkel auf Eis gelegt und nacheinander präparierte Muskeln so behandelt, daß jeder 15 Sekunden lang mit Wasser und Quarzsand verrieben und dann verschiedene Zeiten lang bis zum Eingießen in die Boratlösung stehengelassen wurde. Die Resultate dieses Versuchs sind in der Tabelle VI enthalten, und der Verlauf der traumatischen Ammoniakbildung ist in Abb. 5 wiedergegeben.

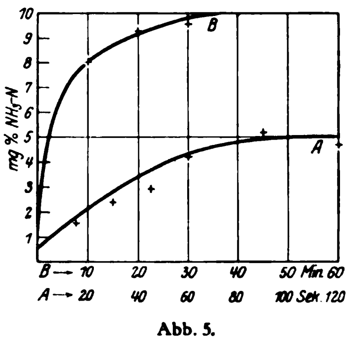


Abb. 5.
Kurve *A*: Traumatische Ammoniakbildung im mit Wasser zerriebenen Froschmuskel. Zeit in Sekunden. Kurve *B*: Traumatische und postmortale Ammoniakbildung im zerkleinerten Kaninchenmuskel. Zeit in Minuten.

Es ist aus den angeführten Versuchen zu ersehen, daß der Vorgang der traumatischen Ammoniakbildung im wesentlichen nach 90 Sekunden abgelaufen ist. Der weitere Zuwachs des Ammoniakgehalts, der im Versuch vom 28. Januar beobachtet wird, entspricht einem Prozeß, den wir noch beschreiben werden. Außer der traumatischen Ammoniakbildung geht im Froschmuskel ein zweiter, langsamer ammoniakabspaltender Vorgang vor sich, der auch im intakten Muskel zu beobachten ist und vielleicht mit dem traumatischen Vorgang wesensgleich ist; auch er wird durch die alkalische Reaktion gehemmt. Der Unterschied zwischen den Geschwindigkeiten beider Prozesse beruht vielleicht darin, daß in dem bei der traumatischen Ammoniakbildung wirksamen System

Ferment und Substrat strukturell aneinandergefügt sind, während das im Gewebe enthaltene Substrat auch frei vorhanden ist und erst an das Ferment herankommen muß. Über das Verhältnis der traumatischen zur postmortalen Ammoniakabspaltung wird uns die vergleichende Betrachtung einige Aufschlüsse geben:

Im Muskel des *Rotfeder* entspricht die traumatische Ammoniakbildung der maximalen Ammoniakmenge, die man in dieser Muskelart beobachten kann. In Warmblütermuskeln summiert sich die traumatische Ammoniakbildung mit dem langsamer verlaufenden Vorgang, den wir schon beim Froschmuskel bemerkt haben, der aber hier eine viel bedeutendere Intensität hat. Dies ist aus den folgenden, am Kaninchenmuskel und am Mäusemuskel ausgeführten Versuchen zu ersehen:

Unterschenkelmuskel eines Kaninchens wurden (22. Februar) in 3 Minuten nach dem Aufschneiden der Halsarterien entnommen und in flüssige Luft gebracht: davon Stücke nacheinander abgewogen, mit Wasser zerrieben und verschieden lange Zeiten stehengelassen. Mit Boraxlösung zerriebene Portionen enthielten 0,46 und 0,65 mg-Proz. NH_3-N. Die mit Wasser zerriebenen enthalten nach

10	20	30	72 Minuten
8,0	9,3	9,5	12,1 mg-Proz. NH_3-N

Bei diesem Kaninchen waren 12,8 mg-Proz. NH_3-N der Grenzwert, den der Ammoniakgehalt der Muskeln nach 24 Stunden bei 16° und nach 72 Stunden bei 0° erreichte.

In Abb. 5 ist die Kurve der traumatischen Ammoniakbildung im Kaninchenmuskel eingezeichnet. Es ist aus ihr zu ersehen, daß in den Warmblütermuskeln der traumatische Vorgang keineswegs so scharf vom postmortalen abzugrenzen ist, wie beim Fisch, Frosch und der Schildkröte. Um den schnell verlaufenden Teil des Vorganges zu erfassen, haben wir bei Warmblütermuskeln immer 5 Minuten lang mit Wasser zerrieben stehengelassen, bevor durch Boratzusatz die Ammoniakbildung stillgelegt wurde.

Der Versuch an (sehr fetten) Mäusemuskeln (16. Februar) ($t = 14°$) gab folgendes Resultat: Nach dem Verlauf von

12	14	17	49 Minuten

nach dem Tode zerriebene Muskelgewebe enthielt nach

10	20	30	41 Minuten
2,5	3,6	4,9	6,2 mg-Proz. NH_3-N

Korrigiert beträgt die traumatisch-postmortale Ammoniakbildung[1]) ungefähr

3,2	5,2	7,8	9,6 mg-Proz. NH_3-N

[1]) Es ist dies nur eine Überschlagsrechnung, bei welcher die traumatische Ammoniakbildung in dem verfetteten Muskel mit 2 multipliziert und dann nach dem Verlauf der postmortalen Ammoniakanhäufung (vgl. S. 433) der Ammoniakgehalt der entsprechenden Zeit subtrahiert wird.



Wir legen größeres Gewicht auf den folgenden Versuch, bei welchem die Muskeln ein normales Aussehen und anscheinend normalen Fettgehalt hatten:

17. Februar. Ein in 21 Minuten nach dem Tode zerriebener und 5 Minuten bis zum Boratzusatz gelassener Muskel (vom Oberschenkel) enthielt 4,83 mg-Proz. NH_3-N.

Der genau symmetrische, in 15 Minuten nach dem Tode zerriebene und 80 Minuten bis zum Boratzusatz bei 14⁰ gehaltene Muskel enthielt: 9,8 mg-Proz. NH_3-N.

Ein anderer Oberschenkelmuskel enthielt sofort nach der Tötung 1,07 mg-Proz. NH_3-N.

5. Versuch einer Analyse der traumatischen Ammoniakbildung.

Wir haben untersucht, in welcher Art das ammoniakbildende System im mit Boratlösung zerriebenen Gewebe verteilt ist; ob in Lösung oder an die festen Teile gebunden; vor allem, ob es nach Aufhebung der hemmenden Boratwirkung wieder wirksam wird.

Es wurden gewogene Muskelmengen mit Boratlösung unter solchen Bedingungen zerrieben, wie sie bei Bestimmung des Ammoniakgehalts eingehalten werden. Zum Brei wurden dann solche Mengen primären Kaliumphosphats zugegeben, als nötig war, um — auf Grund vorhergehender Bestimmung — die Wasserstoffionenkonzentration der Flüssigkeit auf $p_H = 7,3$ zu bringen: dann wurde nach Ablauf einer bestimmten Zeit wieder mit Borax alkalisch gemacht und destilliert. Die angewandte Lösung von KH_2PO_4 (aus einem *Kahlbaum*schen Präparat für Enzymstudien nach *Soerensen*) war ammoniakfrei.

Die Tabelle VII gibt das Resultat zweier Versuche wieder (Rana esculenta, ♂, 1. Februar 1927):

Tabelle VII.

Muskel	Gewicht mg	Ammoniakgehalt nach Zerreiben mit Borax mg-Proz. NH_3-N	Ammoniakgehalt nach Neutralisation des Boratbreies mit KH_2PO_4 auf $p_H = 7,4$ mg-Proz. NH_3-N	Ammoniakgehalt nach Zerreiben mit Wasser mg-Proz. NH_3-N	Nach Neutralisation bis zur wiederholt. Alkalisierung Minuten
Gastrocnemius	402		3,5		3
Oberschenkelmuskel .	281		2,6		3
Gastrocnemius	394	0,76			
Oberschenkelmuskel .	385			5,9	
Gastrocnemius	520	0,6			
„	520		2,5		2
Oberschenkelmuskel .	476			6,3	
2 Tibiales			2,64		5

Andere Versuche (12. Februar) hatten folgenden Verlauf:

a) 1513 mg Muskeln (R. esculenta) wurden mit 10 ccm Borat verrieben und destilliert: sie enthielten 1,09 mg-Proz. NH_3-N.

Der durch Destillation vom Ammoniak befreite Muskelbrei wurde mit noch 5 ccm Boratlösung aufgefüllt. 1 ccm Flüssigkeit entspricht annähernd 100 mg Muskel. 2 ccm der Flüssigkeit brauchen 4 ccm KH_2PO_4-Lösung zur Neutralisation auf $p_H = 7,3$, die durch den Ammoniakgehalt des Phosphats einen Fehler von 0,5 mg-Proz. bedingt. Am Ende des Versuchs zeigt der Muskelbrei einen Ammoniakgehalt, der 0,25 mg-Proz. NH_3-N entspricht. Je 2 ccm des Breies wurden auf bestimmte Zeit neutralisiert und wieder alkalisiert, darauf destilliert.

Nach Zusatz von Phosphat und 12 Minuten im Wasserbad bei 9,4° enthält der Brei 1,8 mg-Proz. NH_3-N (auf frischen Muskel berechnet!).

Der Brei wird zentrifugiert: die Flüssigkeit enthält nach Phosphatzusatz und 44 Minuten bei 9,4°: 2,25 mg-Proz. NH_3-N (wie oben!). Nach 55 Minuten: 2,5 mg-Proz.

b) 1550 mg Muskelfleisch (Rana esculenta) wurden mit 5 ccm Boraxlösung verrieben, vom Quarz möglichst abgegossen; 2 ccm wurden ohne Zusatz destilliert. NH_3-N entsprechend 0,82 mg-Proz. 2 ccm durch Zusatz von 4 ccm KH_2PO_4-Lösung auf $p_H = 7,3$ gebracht und nach 12 Minuten bei 9,4° wieder mit Boraxlösung alkalisiert und destilliert: NH_3-N entsprechend 3,4 mg-Proz.

c) Von demselben Frosch wie b) wurden Muskeln (nicht gewogen) mit Boraxlösung verrieben; die Flüssigkeit abzentrifugiert und auf 15 ccm gebracht; davon wurden 1. 4 ccm destilliert: 0,0055 mg NH_3-N; 2. 4 ccm mit 7,6 ccm KH_2PO_4 versetzt ($p_H = 7,3$) bei 9,4° 12 Minuten lang stehengelassen. Dann mit überschüssiger Boraxlösung versetzt und destilliert: 0,0247 mg NH_3-N.

3. 4 ccm wurden 30 Minuten lang im Brutschrank bei 36° gehalten; dann wie 2. mit Phosphat versetzt und 10 Minuten lang bei 9,4° gehalten. Mit überschüssigem Borax destilliert: 0,0241 mg NH_3-N.

Diese Versuche orientierten uns über die folgenden Punkte:

1. Das ammoniakbildende System ist durch die alkalische Reaktion nicht nur an der Ammoniakabspaltung verhindert, sondern überhaupt stabilisiert und kann durch Neutralisation wieder in einen ähnlichen Zustand gebracht werden wie der, in dem es sich nach Verletzung der Muskelstruktur bei neutraler Reaktion befindet. 2. Das ammoniakbildende System befindet sich in dem flüssigen Anteil des Muskelbreies, scheint aber einen Bestandteil zu enthalten, der an die festen Teile gebunden ist, denn die Ammoniakbildung erfolgt im Muskelbrei schneller als in der Flüssigkeit allein. 3. Das ammoniakbildende System ist auch gegen Inkubation bei 36° beständig, wenn die Reaktion alkalisch ist.

Diese vorläufige Orientierung führte zu weiteren Versuchen, deren Resultate im folgenden wiedergegeben werden:

4 g Muskeln von R. esculenta wurden nacheinander präpariert und sofort mit kleinen Mengen Boraxlösung verrieben, bis die Flüssigkeitsmenge 20 ccm beträgt ($t = 19,2^0$). Der Brei wird vom Quarzsand abgegossen und nach gutem Umschütteln auf drei graduierte Zentrifugenröhrchen verteilt: von diesen werden zwei zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird abgegossen und nochmals zentrifugiert, der Rückstand

auf der Zentrifuge zweimal mit je 10 ccm Boraxlösung gewaschen, das Waschgut verworfen; der Rückstand mit Boraxlösung aufgenommen und gut durchgeschüttelt.

Wir erhalten auf diese Weise folgende Teile:

a) Die Lösung, von welcher 2 ccm 400 mg frischer Muskeln entsprechen.

b) Suspension des Rückstandes in der gleichen Konzentration.

Ferner: Die ursprüngliche Suspension vom Rückstand (b) in Flüssigkeit (a): Suspension (c).

Die folgende Tafel gibt die Ammoniakbildung in der Flüssigkeit, dem Rückstand sowie in der ursprünglichen und aus (a) sowie (b) zusammengesetzten Suspension (c) von Rückstand in Flüssigkeit wieder.

Zur Entwicklung des Ammoniaks wurden 2 ccm Flüssigkeit mit 1,2 ccm KH_2PO_4 versetzt (5 g in 100 ccm), wodurch die Reaktion auf $p_H = 7,4$ gebracht wurde, dann wurde während wechselnder Zeiten bei 14,3° gehalten. Dieselbe Menge Phosphat kam auf je 2 ccm der Suspension (c), oder auf jede 2 ccm der gewaschenen Rückstandssuspension (b), auch wenn sie mit der Flüssigkeit (a) vermischt wurde. Flüssigkeit (a) enthält vor der Neutralisation 0,74 mg-Proz. NH_3-N.

Tabelle VIII.

	Rückstand	Flüssigkeit
Rückstand	I 20′: 0,3 mg-Proz.	II (zusammengesetzt) 10′: 20 : 30 : 3,5 mg-Proz.
Flüssigkeit	III (ursprünglich) 10′: 2,4 mg-Proz. 20 : 4,82 „	IV 10′ : 1,1 mg-Proz. 20 : 1,65 „ 30 : 3,29 „ 16h: 3,25 „

Abb. 6 gibt den Verlauf der Ammoniakbildung entsprechend den Bedingungen der Felder I, II, III und IV wieder, und zum Vergleich in Linie A den Verlauf im frischen zerriebenen Muskel.

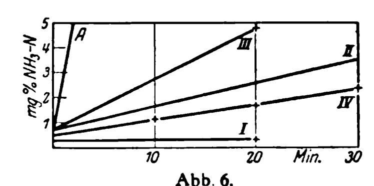


Abb. 6.
Ammoniakbildung im Muskelbrei und seinen Teilen I: In dem ausgewaschenen Rückstand. IV: Im Extrakt. III: Im ursprünglichen Brei. II: Im Gemisch aus Rückstand und Extrakt. A: Im mit Wasser zerriebenem Muskel. Vgl. Tabelle VIII.

Aus diesem Versuch ersieht man, wie der Vorgang der Ammoniakbildung im Muskelbrei zusammengesetzt ist. Der *Rückstand* enthält keine

Vorstufe des Ammoniaks; sie ist vollständig im alkalischen *Boratextrakt* enthalten. Der Extrakt enthält auch die Bedingung des Zerfalls der Vorstufe, d. h. wahrscheinlich ein Ferment, welches bei neutraler Reaktion die Vorstufe unter Abspaltung von Ammoniak spaltet; er enthält aber diesen Faktor nicht in seiner vollen Wirksamkeit, d. h. er enthält entweder nur wenig davon, oder es fehlt noch eine Bedingung der Wirksamkeit dieses Faktors, die an die unlöslichen Teile des Gewebes gebunden bleibt. Die Ammoniakbildung erfolgt in der künstlichen Suspension des ausgewaschenen Rückstandes im Extrakt mit anderthalbmal größerer Geschwindigkeit, als im Extrakt selber; in der ursprünglichen Suspension des (nicht ausgewaschenen) Rückstandes mit dreimal größerer Geschwindigkeit, wobei zu bemerken ist, daß die ursprüngliche Suspension in bezug auf Extrakt und Rückstand dreimal so stark konzentriert ist als die zusammengesetzte; im frisch zerstörten Muskelgewebe aber mit viel größerer Geschwindigkeit. Die Suspension aus Extrakt und Rückstand führt aber zur gleichen Ammoniakmenge für die gleichen Extraktmengen, wie der Extrakt allein, ein Unterschied scheint nur in der für die Umsetzung nötigen Zeit zu bestehen.

Die *traumatische Ammoniakbildung* erfolgt demnach durch Einwirkung eines Ferments auf ein im Muskel vorgebildetes Substrat. Das Substrat ist in Wasser löslich und auch in Gegenwart des Ferments bei alkalischer Reaktion ($p_H = 9{,}3$) beständig. Das Ferment geht zum Teil in den alkalischen Extrakt über, und kann durch Neutralisation wirksam gemacht werden; zum großen Teil aber scheint es an die unlöslichen Teile des Muskelgewebes gebunden zu bleiben; es ist auch in diesem Zustande gegen die Einwirkung der alkalischen Reaktion beständig.

Im Muskel muß das Ferment und das Substrat in einer besonderen, durch die Struktur des Gewebes bedingten Bereitschaft zur gegenseitigen Einwirkung nebeneinander bestehen, ähnlich wie das milchsäurebildende System im frischen Muskel. Die physiologische Funktion dieses Systems soll in den folgenden Abschnitten behandelt werden.

Der Vergleich der traumatischen und der postmortalen Ammoniakbildung wird nämlich zeigen, daß eine ammoniakbildende Substanz auch ohne direkten, bei Verletzung in Wirksamkeit tretenden Zusammenhang mit dem Ferment im Muskel existiert. Während im Muskel des Fisches (Rotfeder) die traumatische Ammoniakbildung die Größe der Ammoniakbildung schlechtweg darstellt, können im Muskel der Amphibien und Reptilien Ammoniakmengen von gleicher Größe wie die traumatischen gebildet werden, ohne die Bereitschaft zur traumatischen Ammoniakbildung zu verringern; in Warmblütermuskeln ist die postmortale Ammoniakbildung größer als die traumatische, und die Geschwindigkeit des postmortalen kommt der des traumatischen viel näher als bei Kaltblütern.

III. Die Schwankungen des Ammoniakgehalts der Muskeln und die Ammoniakbildung im Muskelgewebe.

Durch Zerreiben mit Boraxlösung ist die Möglichkeit gegeben, den Ammoniakgehalt der Muskeln in jedem Zustande festzulegen und zu bestimmen; wir haben diese Methode zur Untersuchung der Schwankungen des Ammoniakgehalts im Zusammenhang mit Zustandsänderungen und Funktion des Muskels angewandt.

Es wurden zunächst diejenigen tiefgehenden, irreversiblen Veränderungen des Muskels untersucht, welche als *Starren* bezeichnet werden.

1. Wärmestarre.

Froschmuskeln wurden durch einstündigen Aufenthalt bei 45° wärmestarr gemacht und ihr Ammoniakgehalt sowie die traumatische Ammoniakbildung mit denen der symmetrischen frischen Muskeln verglichen.

Die Tabelle IX gibt die Resultate wieder. Daten des Versuchs: 1. 18. Februar. Rana esculenta, ♂. Symmetrische Muskeln präpariert, die einen bei Zimmertemperatur (17°) in einer feuchten Kammer, die anderen in kleinen Röhrchen in größere Gläser gestellt, die in einem Wasserbad von 45° standen. 2. Emys europaea. Schultermuskeln, erregbar, nach dem Tode während 21 Stunden bei 5° aufbewahrt.

Tabelle IX.

Muskel	Gewicht mg		Mit Borat zerrieben mg-Proz. NH_3-N	Mit Wasser zerrieben mg-Proz. NH_3-N	Mit 0,6 proz. NaCl zerrieben mg-Proz. NH_3-N
		1. Rana esculenta.			
Tibialis	248	wärmestarr	5,32		
„	235	normal	0,7		
Gastrocnemius . .	238	wärmestarr	5,9		
„ . .	238	normal		5,66	
Adductor	242	„			5,40
		2. Emys europaea.			
Schultermuskel . .	500	wärmestarr	5,7		
„ . .	562	normal		5,56	
„ . .	434	„	1,8		

Die Wärmestarre führt also zu einer Ammoniakanhäufung, welche ebenso hohe Werte erreicht wie die traumatische.

2. Chloroformstarre.

Sorgfältig präparierte Muskeln wurden in mit Chloroform halbgesättigte Ringerlösung eingelegt, während die symmetrischen Muskeln in Ringerlösung gehalten wurden. Temperatur 12°. Die Lösungen wurden mit dem Gewebe mitverarbeitet.

Rana esculenta, ♂. Versuchsdauer 2 Stunden. Gastrocnemien. Der starre Muskel enthält 4,6 mg-Proz. NH_3-N; nach Verreiben mit Wasser 7,25 mg-Proz. NH_3-N.

Der Kontrollmuskel enthält 0,96 mg-Proz. NH_3-N. Nach Verreiben mit Wasser: 6,96 mg-Proz. NH_3-N.

Emys europaea. Schenkelmuskel. 2 Stunden in Chloroformlösung. Der starre Muskel enthält 5,88 mg-Proz. NH_3-N; der Kontrollmuskel (vgl. bei Wärmestarre) 1,8 mg-Proz. NH_3-N.

3. *Wasserstarre.*

Rana esculenta. Adductoren. Die Muskeln wurden in destilliertem Wasser (bei 12°) 3 Stunden gehalten, während die Kontrollmuskeln bei der gleichen Temperatur in Ringerlösung blieben.

a) Der starre Muskel enthält 1,9 mg-Proz. NH_3-N, nach Zerreiben mit Wasser 7,7 mg-Proz. Der Kontrollmuskel enthält 0,96 mg-Proz. NH_3-N, nach Zerreiben mit Wasser 6,9 mg-Proz.

b) Der starre Muskel enthält (nach 3 Stunden) 3,1 mg-Proz. NH_3-N, nach Zerreiben mit Wasser 7,6 mg-Proz. Der Kontrollmuskel enthält 0,6 mg-Proz. NH_3-N, nach Zerreiben mit Wasser 6,5 mg-Proz.

4. *Coffeinstarre.*

Die Wirkung des Coffeins wurde sowohl nach Injektion in Lymphsäcke als auch an isolierten Muskeln untersucht.

7. Februar. Es wurden 2 ccm 1 proz. Coffein-Ringerlösung einer Rana esculenta (♂) in den Brustlymphsack und in die Lymphsäcke der Oberschenkel injiziert. Als das Tier starr wurde, waren die Muskeln der Oberschenkel ganz trübe, die Gastrocnemien und Tibiales noch klar.

Es enthielt mg-Proz. NH_3—N:

Nach Zerreiben mit Borat:	
Gastrocnemius	2,57
Adductor	3,86
Gastrocnemius	2,77
Nach Zerreiben mit Wasser:	
Tibialis	6,26
Adductor	4,37

8. Februar. Einer Rana esculenta wurde, wie im Versuch vom 7. Februar, Coffein injiziert, jedoch gleich nach der Injektion ein Unterschenkel amputiert und zur Analyse gebracht. Die anderen Muskeln wurden nach Erstarrung analysiert. Alle sind starr, aber die Muskeln des Unterschenkels nicht trübe.

Der Gastrocnemius des amputierten Beines enthält 0,68 mg-Proz. NH_3-N und nach Zerreiben mit Wasser 4,84 mg-Proz.

Die erstarrten Muskeln enthalten mg-Proz. NH_3-N:

Mit Borat zerrieben:

Tibialis	4,4
Gastrocnemius	4,0
Adductor	6,15

Nach Zerreiben mit Wasser:

Tibialis	6,0
Gastrocnemius	6,2
Adductor	6,1

Versuche an isolierten Muskeln:

a) 8. Februar. Sorgfältig präparierte Unterschenkelmuskeln (Esculenta) wurden in eine ½proz. Coffein-Ringerlösung bei 12° 2 Stunden lang gehalten. Als Kontrolle diente ein Muskel desselben Beines in Ringerlösung. Die Lösungen werden mit verarbeitet.

Kontrolle enthält	0,96	mg-Proz.	NH_3-N
Traumatischer NH_3-Gehalt	6,96	„	NH_3-N
Coffeinmuskel enthält	7,6	„	NH_3-N
Traumatischer NH_3-Gehalt	7,4	„	NH_3-N

10. Februar (Esculenta):

Kontrollmuskel	0,6	mg-Proz.	NH_3-N
Traumatischer NH_3-Gehalt	6,6	„	NH_3-N
Coffeinmuskel	7,4	„	NH_3-N
Traumatischer NH_3-Gehalt	7,1	„	NH_3-N

Emys europaea. Schenkelmuskeln, 20 Stunden nach dem Tode, erregbar[1]) in einer ½proz. Coffein-Ringerlösung. Nach 3 Stunden: NH_3-N-Gehalt der starren Muskeln 5,12 mg-Proz. NH_3-N, 5,94 mg-Proz. NH_3-N. Kontrollmuskel in Ringerlösung 1,6 mg-Proz.

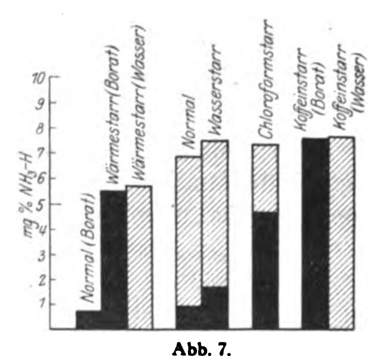


Abb. 7.
Schwarze Felder: Ammoniakgehalt (in mg-Proz. NH_3-N) nach Zerreiben mit Borat. Schraffierte Felder: Nach Zerreiben mit Wasser.

Die Betrachtung des Ammoniakgehalts bei verschiedenen Starren des Froschmuskels läßt zweierlei Verhalten unterscheiden. Die Wärmestarre wirkt wie die mechanische Zerstörung; sie scheint das ammoniakbildende System so weit zu zersetzen, daß eine darauffolgende mechanische Verletzung keine Wirkung mehr hat. Die Wasserstarre und die Chloroformstarre wirken

[1]) Kontraktionsreflex auf Zug des Beines erhalten.

anders: sie lösen die postmortale Ammoniakbildung zwar aus, lassen jedoch das ammoniakbildende System zum Teil intakt. An der Coffeinstarre läßt sich je nach dem Grade der Starre beides beobachten: bei ganz starren Muskeln scheint das ammoniakbildende System und seine Reserven erschöpft zu sein, bei leichteren Starregraden dagegen ist die Ammoniakbildung zwar vorgeschritten, aber immer noch ein auf Zerstörung reagierendes ammoniakbildendes System vorhanden.

Bevor wir zur Betrachtung der postmortalen und der funktionellen Ammoniakbildung kommen, möchten wir noch über die Wirkung zweier, am ganzen Tier untersuchter Faktoren berichten: der Anoxybiose und der Kälte.

5. *Anoxybiose.*

Es wurden zwei Frösche, eine Esculenta und eine Temporaria in Stickstoff gesetzt und unter Durchleiten eines langsamen Stickstoffstromes bei 12⁰ während 6 Stunden gehalten. Nach dieser Zeit sind die Tiere scheinbar tot, die Reflexe sind erloschen. Den Tieren wird je ein Unterschenkel amputiert, sie kommen in gut gelüftetes Wasser und sind nach 2 Stunden völlig erholt.

Der Gastrocnemius der *R. esculenta* zeigt einen Ammoniakgehalt entsprechend 1,1 mg-Proz. NH_3-N; der Gastrocnemius der *Rana temporaria* (nach 7 Stunden in N_2) 0,6 mg-Proz. NH_3-N. Die Anoxybiose allein bedingt folglich auch bei weit fortgeschrittener Erstickung keine Anhäufung von Ammoniak im Muskelgewebe.

6. *Kälte.*

Ein Frosch (R. esculenta) wurde vor das Fenster gesetzt, blieb 18 Stunden draußen und erfor während der Nacht. 8. bis 9. Februar. Die Temperatur hatte in jener Nacht folgenden Verlauf[1]):

8. Februar:	20h24′.	— 2,2° C
9. Februar:	6 24	— 4,8° C

Der Frosch wurde im gefrorenen Zustande zerlegt und der Ammoniakgehalt der Muskeln untersucht, und zwar in der Erwartung, gerade hier sehr niedrige Werte zu finden. Es enthielten:

Gastrocnemius	3,33 mg-Proz.	NH_3-N
Tibialis	4,4 „	NH_3-N
Oberschenkelmuskeln	4,9 „	NH_3-N

Nach Zerreiben mit Wasser wurden in einem Oberschenkelmuskel 6,8 mg-Proz. NH_3-N gefunden.

[1]) Nach Auskunft des Meteorologischen Instituts der Technischen Hochschule in Lwów.

Wir haben später an einer von der Tötung an im gefrorenen Zustande gehaltenen Kaninchenkeule ebenfalls sehr hohe Werte gefunden: nach 48 Stunden 9 mg-Proz., nach 72 Stunden 11,8 Proz.

Das Gefrieren scheint in der Nähe von 0° durch das Durchwachsen der Eisnadeln die Struktur des Gewebes zu zerstören und die traumatische Ammoniakbildung auszulösen, ohne noch den fermentativen Prozeß stillzulegen[1]).

7. Die postmortale Ammoniakbildung und das Verhalten des ammoniakbildenden Systems im isolierten Muskel[2]).

Die Auffindung eines metastabilen ammoniakbildenden Systems im quergestreiften Muskel ließ erwarten — nach Analogie des Verhaltens des milchsäurebildenden Systems —, daß im Muskel eine stetige Ammoniakabspaltung vor sich geht, und schon die ersten Versuche zeigten, daß sich im isolierten Froschmuskel Ammoniak langsam anhäuft. Die ursprüngliche Vorstellung, daß dieser Vorgang unter Verbrauch des ammoniakbildenden Systems erfolgt, erwies sich für den Froschmuskel bei 12° nicht richtig, es wurde gefunden, daß während 2 bis 3 Tagen die Ammoniakbildung zwar erfolgt, das ammoniakbildende System aber nicht verschwindet: dagegen geht in denselben Muskeln bei 22° die ammoniakbildende Substanz bald verloren. Vergleichende Untersuchungen lehrten uns Muskelarten unterscheiden, in welchen die Ammoniakbildung nur auf Kosten des zur traumatischen Ammoniakbildung bereit stehenden ammoniakbildenden Systems erfolgt, andere, in welchen ein spontaner, im unverletzten Muskel verlaufender Vorgang in wenigen Stunden mehr Ammoniak anhäuft als im Froschmuskel bei gleicher Temperatur in 3 Tagen entsteht.

In den ersten Versuchsserien am Frosch sind wir zuerst dadurch irregeführt worden, daß wir die Unterschiede im postmortalen Verhalten

[1]) Bei tiefen Kältegraden (Temperatur der flüssigen Luft) bleibt dagegen, wie selbstverständlich, die Ammoniakanhäufung im Muskel auch während 24 Stunden aus, wovon wir uns überzeugt haben.

[2]) An dieser Stelle möchten wir auf die Arbeit von *Lee* und *Tashiro* (Amer. Journ. of Physiol. **61**, 244, 1922) zurückkommen. In dieser vielzitierten Untersuchung wurde die Abgabe von Ammoniak (oder flüchtiger Base) durch ruhende oder arbeitende Froschmuskeln an im gleichen Luftraum befindliche Säure bestimmt. Diese Versuchsanordnung gestattet keinerlei Schlüsse über Bildung oder Verschwinden von Ammoniak im Muskel und die diesbezüglichen Schlüsse der Autoren sind in den meisten Punkten sicher falsch: so, wenn sie z. B. finden, daß der tetanisierte oder zerkleinerte Muskel kein Ammoniak entwickelt. Die Zahlen von *Lee* und *Tashiro* für die postmortale Ammoniakabgabe betragen 0,16 mg-Proz. in der Stunde, also viel mehr, als hier gefunden wird.



verschiedener Muskeln desselben Tieres und verschiedener Individuen verkannt haben. Man findet in den frischen Muskeln eines Frosches wohl den gleichen Ammoniakgehalt, aber durchaus nicht die gleiche traumatische Ammoniakbildung: sie ist bei Fröschen in den Oberschenkelmuskeln meist höher als in Unterschenkelmuskeln. Wenn man die Kurven des Ammoniakgehalts als Funktion der Zeit bestimmt, muß man diesen Umstand im Auge behalten.

Wir haben an Froschmuskeln besondere Versuche angestellt, um festzustellen, ob ein Einfluß der Sauerstoffversorgung zu beobachten ist; es konnte doch ein solcher Einfluß nach der Analogie mit der Bildung und dem Verschwinden der Milchsäure im Muskelgewebe vermutet werden. *Wir haben jedoch keinen sicher feststellbaren Einfluß von Oxybiose und Anoxybiose auf das ammoniakbildende System und die Ammoniakanhäufung im Muskelgewebe feststellen können.*

Wir werden die postmortale Ammoniakbildung in tabellarischen Zusammenstellungen und Kurvenbildern nach Tierklassen geordnet mitteilen.

Im Muskel der Rotfeder wird nach den Zahlen der Tabelle X und den Kurven der Abbildung 8 das Ammoniak unter Verbrauch des ammoniakbildenden Systems gebildet. Der traumatische Effekt wird mit der Zeit immer geringer und die Summe des im Muskel an-

Tabelle X.

18. Februar. Scardinius erythrophthalmus (12°) (Rotfeder). Rückenmuskel.

Muskelgewicht mg	Zeit nach Tötung Minuten	NH_3-N-Gehalt mg-Proz. nach Zerreiben mit Borat	Wasser
488	6	1,92	
540	8		8,37
433	60	2,1	
455	275	4,4	
440	300	3,9	
520	285		9,1
250	1440	9,0	
188	1450		9,4
169	1470	9,0	
175	1480		9,5
154	2880	9,4	
222	2885		9,5

gehäuften und des traumatischen Ammoniakstickstoffs bleibt innerhalb der Versuchszeit (25 Stunden) konstant.

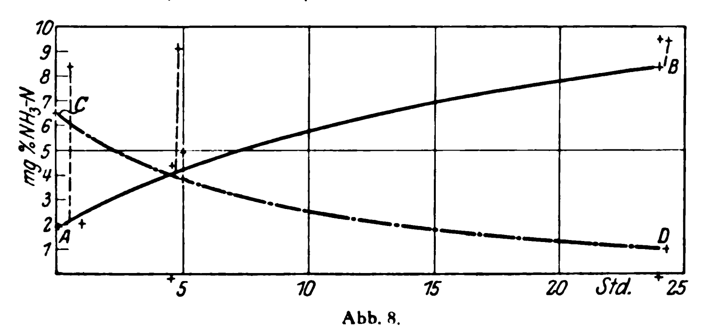


Abb. 8.

Postmortale und traumatische Ammoniakbildung in Muskeln von Scardinius erythrophtalmus.
A——*B*: Ammoniakgehalt als Funktion der Zeit nach Tötung (12°).
M– – – : Traumatischer Effekt (nach Zerreiben mit Wasser) zu verschiedenen Überlebenszeiten.
C–·–·–*D*: Das ammoniakbildende System (in mg Prozent NH_3-N) zu verschiedenen Überlebenszeiten. (Vgl. Tabelle X.)

Tabelle XI.

14. Februar. Emys europaea, ♂[1]) (800 g), Sumpfschildkröte, $t = 12°$).
Schultermuskel.

Muskelgewicht mg	Zeit nach Tötung Minuten	NH_3-N-Gehalt mg-Proz. nach Zerreiben mit Borat	NH_3-N-Gehalt mg-Proz. nach Zerreiben mit Wasser
512	30	0,78	
520	35		3,4
503	37		2,8
500	1230	1,84	
273	1236	1,59	
735	1240	2,08	
562	1260		5,18
546	1265		5,56
500	1500		5,58

Die Zahlen und die Kurven zeigen ein sehr einfaches Verhalten: Im Schildkrötenmuskel erfolgt bei 12° die Ammoniakbildung mit der Geschwindigkeit von 0,05 mg-Proz. in der Stunde, und innerhalb der ersten 25 Stunden bleibt der Effekt einer mechanischen Zerstörung des Gewebes der gleiche, wie am frischen Muskel. Es wird folglich das

[1]) Der Ammoniakgehalt des Blutes von Emys wurde bei dieser Gelegenheit bestimmt und hat folgenden Verlauf (Blut aus Halsarterie) ($t = 12°$):

Zeit nach Entnahme Minuten	Analysiert mg	NH_3-N mg-Proz.
120	2000	0,46
1440	2000	2,1
2888	2000	2,57

ammoniakbildende System nicht verändert, und es soll später überlegt werden, ob seine Beständigkeit darauf beruht, daß es kein Ammoniak abspaltet. oder auf einer dauernden Regeneration.

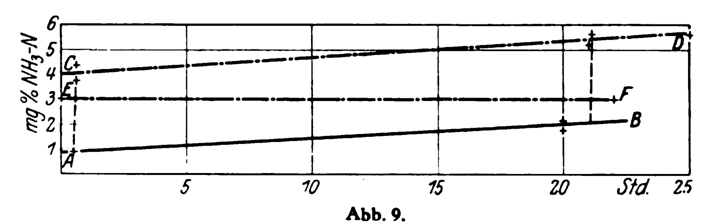


Abb. 9.

Postmortale und traumatische Ammoniakbildung in Muskeln von Emys europea.
A —— *B*: Ammoniakgehalt.
C - - - *D*: Summe aus Ammoniakgehalt und traumatischer Ammoniakbildung.
E · - - · *F*: Traumatische Ammoniakbildung. (Vgl. Tabelle XI.)

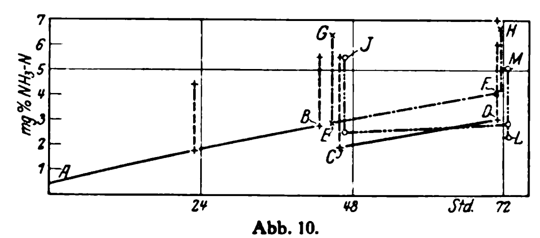


Abb. 10.

Postmortale Ammoniakbildung und traumatischer Effekt bei Rana temporaria. (Vgl. Versuch 47 a, Tabelle XII.) *A* —— *B*: Ammoniakgehalt. ----- Traumatischer Effekt in M. gastrocnemii und tibiales bei Frosch II. *E* -·-·- *F*: Ammoniakgehalt. *E* -·-·- *G* und *F* -·-·- *H*: Bei denselben Muskeln und Frosch I. *C* —— *D*: Ammoniakgehalt. *C*----- und *D* -----: Traumatischer Effekt bei den Adduktoren, Frosch II. ○-·-·-○ Ammoniakgehalt. ○-·-·- *J* und ○ - - - *M* Traumatischer Effekt. M. tibialis und Gastrocnemius, Frosch III. *L* -·-·- *M*: Traumatischer Effekt, Adduktoren, Frosch III (2. bis 5. III.).

Der über 72 Stunden ausgedehnte Versuch 47 ergibt, wie die Betrachtung der Zahlen in der Tabelle XII und der Kurven der Abb. 6 zeigen, ein sehr klares Resultat. Die Ammoniakbildung erfolgt in verschiedenen Muskeln und verschiedenen Individuen endogen mit nicht ganz gleicher Intensität, aber *der traumatische Effekt* bleibt auch nach 72 Stunden kaum merklich verändert. Die Verhältnisse liegen also ähnlich, wie bei der Schildkröte, bei der wir allerdings keine so langdauernden Versuche durchgeführt haben.

Es ist bemerkenswert, daß nach 72 Stunden, wenn der Ammoniakgehalt auf 2,9 mg-Proz. gestiegen ist, also das Sechsfache des Anfangswertes erreicht hat, der traumatische Effekt immer noch 2 bis 2,5 mg-Proz. beträgt.

Man kann diese Verhältnisse auf verschiedene Weise deuten. Entweder geht eine von der Zersetzung des ammoniakbildenden Systems, das auf *Reize* zu reagieren bereit ist, unabhängige Ammoniakbildung vor sich, und das System bleibt in Ruhe und Bereitschaft; oder aber zersetzt sich das System, wie sich die Muttersubstanz der Milchsäure und letzter

Rana temporaria.

Versuch 47a (2. bis 5. III.). Es wurden drei große starke männliche Temporarien getötet und die Schenkelpräparate möglichst steril angefertigt. Sie wurden an den Beckenknochen auf Aluminiumdrahthaken in einem großen Glas (wenig Ringerlösung enthaltend) frei aufgehängt und in ein Wasserbad von 13° versenkt. Das Glas wurde mit feuchtem Sauerstoff gefüllt und die Zuleitungen geschlossen. Für die Versuche wurde die Aufhängung herausgehoben, Unterschenkel oder Oberschenkel schnell amputiert und die Präparate wieder versenkt. Nach 72 Stunden war noch keine Spur von Fäulnisgeruch wahrzunehmen. Die drei Frösche sind als I, II und III bezeichnet. Die Kolonnen 3 „Borat" und 4 „Wasser" geben die Werte des Ammoniakgehalts (3) und des traumatischen Ammoniakgehalts (4).

Tabelle XII.

1	2	3	4	2	3	4	2	3	4	
Zeit	Frosch I			Frosch II			Frosch III			
	Muskel	Borat	Wasser	Muskel	Borat	Wasser	Muskel	Borat	Wasser	
23h				Tibialis	1,6					erregbar
23 10'				„		5,32				
23 20				Gastrocn.	1,83					
23 30				„		4,44				
43				Tibialis	2,84					
43 20				Gastrocn.	2,65					
43 10				„		5,55				
43 30	Tibialis		6,4							
44 40	Adductor	2,9								
44 50	„		6,5							
46				Adductor	1.94					
46 10				„		5,52				
46 20				„		5,37				
46 30							Tibialis	2,46		
46 40							Gastrocn.		5,38	
70	Tibialis		6,74							unerregbar
70 10	Adductor		6,48							
70 20	„	4,04								
70 30	„	4,06								
70 40	Gastrocn.	4,08								
70 50	„		6,4							
71				Adductor	3,0					unerregb.
71 30				„		6,3				
72				„	3,0					
72 10				„		5,7				
72 20							Tibialis	2,9		erregbar
72 30							Adductor	2,1		
72 30							„		5,1	
72 40							„	2,5		
72 50							„		4,6	

Linie das Glykogen im Muskel zersetzt, und wird neu gebildet, indem neue ammoniakbildende Substanz an das strukturell festgelegte Ferment gebunden wird. Auf diese Weise könnte sich das Ammoniak im Muskelgewebe anhäufen und immer wieder entstehen können, solange noch ammoniakbildende Substanz vorhanden ist.

Versuch 47b (2. bis 4. III.). Drei große kräftige Temporarien (♂) wurden genau wie in Versuch 47a behandelt, aber das Gefäß wurde in einen Wärmeschrank von 23° gebracht. Nach 48 Stunden war schon deutlicher Fäulnisgeruch vorhanden. Die Muskeln wurden deshalb vor der Verarbeitung durch einen kräftigen Wasserstrahl aus der Leitung während einiger Sekunden abgespült, sofort in kalte *Ringer*sche Lösung getaucht und mit reinem Filtrierpapier abgetrocknet: diese Behandlung sollte die in der Oberfläche erzeugten Fäulnisprodukte beseitigen. Bedeutung der Zahlen wie bei Versuch 47a.

Tabelle XIII.

1	2	3	4	2	3	4	2	3	4	
	Frosch I			Frosch II			Frosch III			
Zeit	Muskel	Ammoniakgehalt mg-Proz. NH_3-N	Traumatischer Ammoniakgehalt mg-Proz. NH_3-N	Muskel	Ammoniakgehalt mg-Proz. NH_3-N	Traumatischer Ammoniakgehalt mg-Proz. NH_3-N	Muskel	Ammoniakgehalt mg-Proz. NH_3-N	Traumatischer Ammoniakgehalt mg-Proz. NH_3-N	
17h30′	Tibialis	3,42								unerregbar
17 40				Tibialis		6,7				
17 50	Gastrocn.	3,4								
17 55	"		6,1							
18 10				Gastrocn.	4,05					
18 20				"		6,5				
42	Tibialis	4,5								
42 10	Gastrocn.		6,8							
42 20	"	4,44								
42 30	Adductor	6,5								
42 40	"		7,8							
42 50				Tibialis	10,6					
43				Gastrocn.		11,3				
43 20							Tibialis		8,8	starr
43 30							Gastrocn.	5,8		
43 40							"		7,8	
48							Tibialis	17,6		
48 20							Gastrocn.		17,3	

Der bei höherer Temperatur durchgeführte Versuch — wir haben mehrere solcher Versuche durchgeführt — steht an Deutlichkeit weit hinter dem Versuch 47a. Der Verlauf der Ammoniakbildung in den Muskeln des Frosches II und III ist vielleicht im Laufe des zweiten Tages (für II) und des dritten Tages (für III) durch bakterielle Vorgänge beeinflußt. Bemerkenswert ist nur der Verlauf der Ammoniakbildung beim Frosch I bei 23°, dessen Endresultat nach 42 Stunden demjenigen sehr ähnlich ist, welches bei 13° in 72 Stunden erreicht worden ist, und dessen flacher Verlauf in den letzten 20 Stunden darauf hinweist, daß die freie ammoniakbildende Substanz hier schon verbraucht, das ammoniakbildende System aber, dem traumatischen Effekt nach zu urteilen, noch erhalten ist. Bei den höheren Werten, von denen wir nicht zu sagen vermögen, ob sie autolytischen oder bakteriellen

Prozessen zuzuschreiben sind — wir neigen eher zur ersteren Annahme — verschwindet die traumatische Ammoniakbildung. Wir möchten indessen aus diesem Versuch nicht zuviel Schlüsse ziehen.

Einen Versuch, in welchem zwei Esculenten so geteilt wurden, daß je eine Hälfte beider Tiere in Stickstoff (I_{N_2} und II_{N_2}), je eine in Sauerstoff kam (I_{O_2} und II_{O_2}) und nach verschiedenen Zeiten bei 12° analysiert wurden, gibt die folgende Zusammenstellung wieder (3. II. bis 6. II.):

Tabelle XIV.

Zeit	IN_2		IO_2		IIN_2		IIO_2	
	Borat	Wasser	Borat	Wasser	Borat	Wasser	Borat	Wasser
24 Std.					1,84	4,63	1,9	4,9
44 „					2,03	7,14	2,3	6,8
67 „	2,5	9,0	3,4	10,2				

In diesem Versuch wurde nicht darauf geachtet, die Probeentnahme so einzurichten, um vergleichbare Werte aus symmetrischen Muskeln desselben Individuums zu gewinnen; er zeigt jedenfalls, daß Anwesenheit oder Abwesenheit von Sauerstoff keinen wesentlichen Einfluß auf die Entwicklung des Ammoniakgehalts im Muskel ausübt. Noch ein anderer Versuch (Ranae esculentae, 12 bis 13°) sei hier angeführt (21. I.):

Tabelle XV.

Zeit	mg-Proz. NH_3-N nach Aufenthalt in			
	Stickstoff		Sauerstoff	
	nach Zerreiben mit			
	Borat	Wasser	Borat	Wasser
19 Stunden . .	1,54	6,3	1,66	5,8
43 „ . .	3,0	7,85	2,6	7,83
67 „ . .	4,1	7,7	2,95	8,2
72 „ . .	4,66	8,3	3,4	8,8

Auch hier ist keine Rücksicht auf die strenge Vergleichbarkeit der Muskeln genommen worden.

Schließlich noch eine Versuchsreihe bei höherer Temperatur (22°), an drei Esculenten (A, B, C) in Stickstoff (19. I.):

Tabelle XVI.

	Zeit	Zerrieben mit Borat mg-Proz. NH_3-N	Zerrieben mit Wasser mg-Proz. NH_3-N
A	2h30′	1,17	5,5
A	24	4,4	6,1
B	28	3,0	6,2
C	28 30	3,5	5,5
C	48	9,6	9,6
B	48 30	11,2	11,6

Das Resultat ist hier dem des Versuchs 47b sehr ähnlich, trotzdem er anaerob geführt wurde.

In einem anderen Versuch (18, vom 3. Februar) zeigten Oberschenkelmuskeln, in Sauerstoff bei 11° während 48 Stunden aufbewahrt (Rana esculenta), folgende Werte:

Sartorius
mit Borat zerrieben . . . . . . 3,57 mg-Proz. NH_3-N
„ Wasser „ . . . . 9,2 „ NH_3-N
Semimembranosus
mit Borat zerrieben . . . . . . 3,1 „ NH_3-N
„ Wasser „ . . . . 9,1 „ NH_3-N

Auch aus diesen Zahlen ergibt sich kein deutlicher Unterschied zwischen der postmortalen Ammoniakanhäufung in einer Sauerstoffatmosphäre und in Stickstoff. Wenn indessen feinere Versuche einen Unterschied ergeben sollten, so ist er jedenfalls mit demjenigen nicht zu vergleichen, welcher zwischen der anoxybiotischen und der aeroben Milchsäureanhäufung besteht. Wir werden später noch darüber berichten, daß eine Rückgängigmachung der Ammoniakanhäufung im ermüdeten Muskel durch Aufenthalt in Sauerstoff nicht gelingt. Die Ammoniakbildung im isolierten Muskel scheint ein rein katabolischer Vorgang zu sein, ohne die oxydativ anabolische Periodizität, wie sie durch die *Meyerhof*sche Reaktion im Kohlehydratstoffwechsel dargestellt wird.

Columba livia.

Die Ammoniakanhäufung und das Verhalten des ammoniakbildenden Systems in den Muskeln der Taube wird in den Versuchen der Tabelle XVII dargestellt.

Tabelle XVII.

25. Februar. Taube, durch Köpfen entblutet, sehr schnell gerupft, ausgeweidet, Herz, Magen, Schenkel und Brustmuskel abpräpariert. $t = 20°$ (wo nicht anders vermerkt).

Gewicht mg	Zeit vom Töten an Minuten	mg-Proz. NH_3-N nach Zerreiben mit Borat	mg-Proz. NH_3-N nach Zerreiben mit Wasser	mg-Proz. NH_3-N postmortal gebildet	mg-Proz. NH_3-N traumatisch
		Oberschenkel.			
508	7 } $t = 6°$	0,8			
463	30 } $t = 6°$	[1,4]*)	3,97	[0,6]*)	2,6**)
481	90 } $t = 6°$	2,85			
444	380	8,8		8	
463	385		8,8		0
428	1560	11,2		10,4	
440	1570		10,8		0

*) Zwischen dem Wert nach 7 und 90 Minuten interpoliert.

**) Aus dem ermittelten NH_3-N-Gehalt nach Zerreiben mit Wasser und dem für dieselbe Zeit interpolierten Wert (Kolonne 4) berechnet.

Tabelle XVII (Fortsetzung).

Gewicht mg	Zeit vom Töten an Minuten	mg-Proz. NH_3-N nach Zerreiben mit Borat	mg-Proz. NH_3-N nach Zerreiben mit Wasser	mg-Proz. NH_3-N postmortal gebildet	mg-Proz. NH_3-N traumatisch
		Brustmuskel.			
490	72 }	4,3		[3,5] *)	
492	79 } t = 80		7,2		2,4
428	85 }	5,2		4,4	
494	335	11,2		10,4	
474	337		11,7		0,5?
481	1440	14,5		13,7	
492	1445		14,8		0,3?
506	1460	15,2		14,4	
		Magenmuskel.			
481	13	0,71			
487	16		1,35		0,64
420	350	5,7		5,2	
467	355		5,9		0,2?
480	1560	9,4		8,5	
448	1565		9,6		0,2?
		Herz (Kammer).			
515	25	1,36			
473	33		4,02		2,66
482	360	6,2		4,8	
484	365		6,2		0

*) Unter der Annahme des Anfangs-Ruhewertes 0,8 mg-Proz.

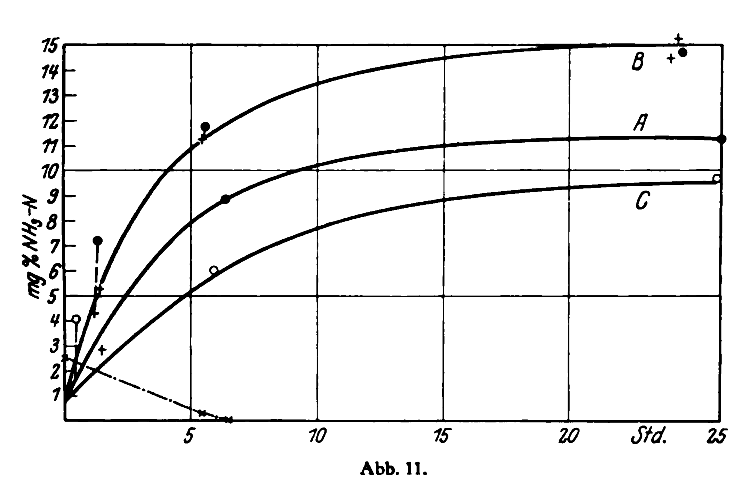


Abb. 11.

Postmortale Ammoniakbildung und traumatischer Effekt in Muskeln von Columba livia (vgl. Tabelle XVII).

A: Schenkelmuskeln. *B*: Brustmuskeln. *C*: Magenmuskeln.

+ : Nach Zerreiben mit Borat. ⊕ : Nach Zerreiben mit Wasser.

- - - - : Traumatischer Effekt. ×—·—·—×: Das ammoniakbildende System.

Die Betrachtung dieser Tabelle XVII zeigt zunächst, daß in den Muskeln der Taube — und zwar in Skelettmuskeln wie im Herzmuskel — das ammoniakbildende System vorhanden ist, daß aber der *traumatische Effekt* geringer ist, als im Muskel der untersuchten Kaltblüter. Das System ist auch sehr *unbeständig*; die Fähigkeit zur traumatischen Reaktion verschwindet unterhalb der Körpertemperatur in wenigen Stunden. Dagegen wird eine Ammoniakbildung im intakten Muskel beobachtet, die wir weiterhin zwar als *postmortale* bezeichnen, jedoch als einen vitalen, im isolierten Organ fortgesetzten Vorgang betrachten. Dieser Vorgang bringt den Ammoniakgehalt der Schenkelmuskeln bei 20° in 6 Stunden dreimal so hoch, als die Erschöpfung des ammoniakbildenden Systems es vermöchte; in der Brustmuskulatur auf das Vierfache, im Herzen auf das Doppelte, im Magenmuskel, wo der traumatische Effekt überhaupt fehlt, auf denjenigen Wert, den der Froschmuskel bei der gleichen Temperatur erst nach 40 Stunden erreicht.

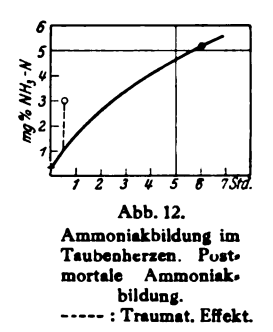


Abb. 12.
Ammoniakbildung im Taubenherzen. Postmortale Ammoniakbildung.
----- : Traumat. Effekt.

Säugetiere.

1. Maus (Mus musculus).

Die Versuche an Mäusemuskeln waren die ersten, in welchen wir uns über das Verhalten der Warmblütergewebe orientiert haben. Wir haben über die postmortale Ammoniakanhäufung in Mäusemuskeln nur einen sechsstündigen, bei 14° durchgeführten Versuch.

18. Februar. Das Tier wurde mit CO_2 betäubt und sofort entblutet; gehäutet und präpariert. Verwendet wurden Oberschenkelmuskeln.

Tabelle XVIII.

Zeit seit Tötung Minuten	Gewicht des Muskels mg	mg-Proz. NH_3-N (zerrieben mit Borat)	mg-Proz. NH_3-N (zerrieben mit Wasser)	mg-Proz. NH_3-N (traumatisch gebildet)	mg-Proz. NH_3-N (postmortal gebildet)
5	450	0,72			
7	490		3,5	2,8	
22	317	0,97			0,25
120	510		5,64	2,1	
135	456	3,5			2,8
330	266	5,0			4,3
336	446		7,8	2,8	

In den Mausmuskeln bleibt nach diesen Zahlen in einem Versuch von über 5 Stunden das ammoniakbildende System noch erhalten. Wir möchten aber zu der Beurteilung dieser Zahlen bemerken, daß das Gewebe in den Wasserversuchen 10 Minuten zerrieben blieb. Die Werte für die

traumatische Ammoniakbildung sind hier viel weniger genau bestimmt, denn sie verschmilzt mit der im zerkleinerten Mäusemuskel sehr bedeutenden postmortalen Ammoniakbildung (s. S. 404).

Lepus cuniculus.

In dem Versuch am Kaninchen wurden einzelne Muskelgruppen bei verschiedenen Temperaturen beobachtet.

Tabelle XIX.

Kaninchen durch Entbluten getötet; Anfangswerte unter Verwendung flüssiger Luft bestimmt.

Temperatur	Muskel (Gewicht) mg	Zeit von Tötung an Minuten	mg-Proz. NH_3-N nach Zerreiben mit Borat	mg-Proz. NH_3-N nach Zerreiben mit Wasser	postmortal gebildet	traumatisch gebildet
			Unterschenkelmuskel			
−180°	320	3	0,46			
16,5°	550	3		4,2		3,74
16,5°	508	240	6,6		5,14	
16,5°	475	250	7,2		6,7	
16,5°	462	260		9,5		2,6
16,5°	516	1440	11,2		10,7	
16,5°	518	1445		11,8		0,6
−2° bis −4° (gefroren)	462	2900	9,5			
−2° bis −4° (gefroren)	453	2900	8,9			
−2° bis −4° (gefroren)	442	4300	11,8			
−2° bis −4° (gefroren)	442	2900		11,5 5h lang bei 16,5° in zerriebenem Zustand		
−2° bis −4° (gefroren)	390	4300		12,8 30′ lang bei 51° in zerriebenem Zustand		
37°	411	62	4,3		3,8	
37°	396	91		8,2		3,9
37°	470	367	9,3		8,8	
37°	480	402		9,9		0,6
			Oberschenkelmuskel			
16,5°	396	1380	9,0			
16,5°	214	1390		8,9		
			Herz			
16,5°	477	5	1,38	1,67		
16,5°	583	337	2,43			
16,5°	593	335		2,7		

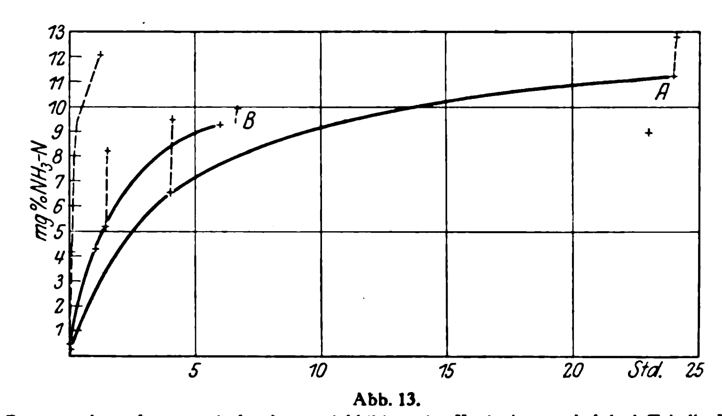


Abb. 13.
Postmortale und traumatische Ammoniakbildung im Kaninchenmuskel (vgl. Tabelle XIX).
A: Schenkelmuskeln bei 16,5°. *B*: Schenkelmuskeln bei 37°.
——: Ammoniakgehalt. -----: Traumatischer Effekt. Erste steile ----- Linie: Traumatischer Effekt und postmortale Ammoniakbildung im Muskelbrei.

An *Katzenmuskeln* liegen folgende Beobachtungen vor:

Vorderpfote einer Katze in Enthirnungsstarre:
mit Borat zerrieben . . . . . . 0,92 mg-Proz. NH_3-N
„ Wasser „ . . . . . . 3,18 „ NH_3-N

In 1 Stunde nach dem Tode bei 37°:
mit Borat zerrieben . . . . . . 2,6 mg-Proz. NH_3-N
„ Wasser „ . . . . . . 5,8 „ NH_3-N

In 4 Stunden nach dem Tode bei 37°:
mit Borat zerrieben . . . . . . 8,08 mg-Proz. NH_3-N
„ Wasser „ . . . . . . 7,9 „ NH_3-N

An menschlichen Muskeln:

Bei einer Operation entnommener *M. iliocostalis lumborum*:
Nach 11 Minuten (0°):
mit Borat zerrieben . . . . . . 0,2 mg-Proz. NH_3-N
Nach 14 Minuten (0°):
mit Wasser zerrieben . . . . . 2,64 mg-Proz. NH_3-N
Nach 276 Minuten (20°):
mit Borat zerrieben . . . . . . 2,98 mg-Proz. NH_3-N
Nach 280 Minuten (20°):
mit Wasser zerrieben . . . . . 3,8 mg-Proz. NH_3-N

Der Versuch am Kaninchenmuskel und die fragmentarischen Versuche am Muskel von Katze und Mensch zeigen wieder dasselbe, was wir am Taubenmuskel bemerkt haben: den intensiven Vorgang der postmortalen Ammoniakbildung und die Unbeständigkeit des zur traumatischen Reaktion bereiten ammoniakbildenden Systems.

IV. Arbeitsleistung und Ammoniakgehalt.

In diesem Abschnitt, dessen Gegenstand in einer weiteren Mitteilung behandelt werden soll, sind einige Versuche über Ammoniakanhäufung und Ermüdung; seinen fragmentarischen Charakter möchten wir damit rechtfertigen, daß die hier mitgeteilten Versuche uns orientieren sollten, ob ein Zusammenhang zwischen Ammoniakgehalt und Ermüdung überhaupt besteht[1]).

Tabelle XX.

Art	Datum	Reiz	Muskel	Gewicht	mg-Proz. NH_3-N nach Zerreiben mit Borat	mit Wasser
Esculenta ♂	19. I.	*)	Gastrocnemius	236	0,7	
		1 Std. lang Tetani von etwa 0,1", alle 1"	"	244	2,3	
Temporaria ♂	7. II.	0,2 mg Strychnin Auf der Höhe der Krämpfe getötet	"	550	2,45	
			Tibialis	400		5,3
			Oberschenkel-muskel	460	2,40	
				392		6,3
			"	456	2,43	
		**)	Gastrocnemius	552	0,77	
			Tibialis	400		5,0
Temporaria ♂	9. II.	0,15 mg Strychnin (Brustlymphsack) Auf der Höhe der Krämpfe getötet	Gastrocnemius	568	2,64	
			"	554		4,1
			Tibialis	362	3,11	
			"	383		5,34
Temporaria ♂	9. II.	**)	Gastrocnemius	548	0,9	
		0,15 mg Strychnin (Brustlymphsack) Auf der Höhe der Krämpfe getötet	Tibialis	371		5,09
			Gastrocnemius	548	2,05	
			Tibialis	382		5,1
			Oberschenkel-muskel	590	2,65	
				560		6,0
			"	398	3,0	

*) Der ungereizte symmetrische Muskel vom Präparat nicht abgetrennt und gleichzeitig verarbeitet.

**) Vor dem Auftreten der Krämpfe amputiert.

---

[1]) *Nachtrag während der Korrektur*: In einer soeben erschienenen Mitteilung stellt *G. Embden* die Vermehrung des Ammoniakgehalts in isolierten Froschmuskeln während deren Tätigkeit (bei künstlicher Reizung) fest (Klin. Wochenschr. **6**, 628, 2. April 1927). Mit den angeführten Versuchen stimmen die hier anzuführenden zum Teil überein, wir möchten jedoch feststellen, daß wir niemals eine Andeutung der von *Embden* beschriebenen *Reversibilität* der Ammoniakanhäufung im isolierten Muskel beobachten konnten.

Daß es nicht die Strychninwirkung auf den Muskel selber war, die Ammoniakanhäufung bewirkt hat, wurde in einem besonderen Versuch festgestellt. Symmetrische Muskeln (Gastrocnemii) wurden in eine Ringerlösung und in eine Strychnin-Ringerlösung von 0,01 Proz. gebracht; der Strychninmuskel enthielt nach 3 Stunden bei 12°: 0,78 mg-Proz. NH_3-N, der Kontrollmuskel 0,9 mg-Proz.

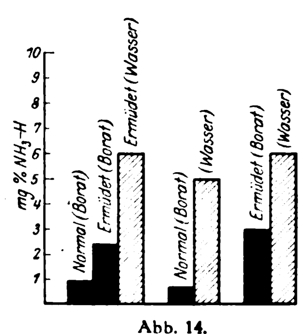


Abb. 14. Ammoniakbildung bei der Muskeltätigkeit. Schwarze Felder: Nach Zerreiben mit Borat. Schraffierte Felder: Nach Zerreiben mit Wasser (vgl. Tabelle XX).

Das Ergebnis der Ermüdungsversuche läßt sich vorläufig dahin zusammenfassen, daß die Ermüdung durch tetanische Reize, ob künstlich oder auch reflektorisch zu einer Anhäufung von Ammoniak im Muskel führt. Diese Anhäufung beträgt etwa die Hälfte der als traumatischer Effekt auftretenden Menge. Das ammoniakbildende System wird dabei anscheinend teilweise verbraucht.

V. Schlußbetrachtung.

1. *Die Herkunft des Ammoniaks.*

Eine Spekulation über die Natur des Körpers, aus welchem bei der traumatischen und der postmortalen Ammoniakbildung das Ammoniak entsteht, wäre zurzeit müßig; wir haben noch keinerlei Anhaltspunkte und wissen nicht einmal, ob er zu den kolloiden oder nichtkolloiden Bestandteilen des Muskels gehört. Wir werden auf diese Frage in einer späteren Mitteilung zurückkommen, vorläufig möchten wir nur einige Punkte kurz festlegen:

Die Muttersubstanz des Ammoniaks ist in alkalischer wie in saurer Lösung beständig, zumindest spaltet sie ohne Mitwirkung eines auf bestimmte Wasserstoffionenkonzentrationen eingestellten fermentativen Faktors kein Ammoniak ab. Sie ist *nicht* mit dem *Cyanation* zu identifizieren, zu dem man bei Erklärungen des Stoffwechsels stickstoffhaltiger Stoffe so gerne greift[1]), denn sie spaltet beim Zerreiben des Muskels mit n/10 Salzsäure kein Ammoniak ab. Sie hängt auch nicht mit Harnstoff zusammen, weder in dem traumatischen, noch in dem postmortalen Vorgang: wir müssen in dieser Frage *Gad Andersen*[2]) widersprechen und feststellen, daß wir in Froschmuskeln und Kaninchen-

---

[1]) *W. F. Fearon*, Biochem. Journ. **17**, 85, 1923; **18**, 576, 1924; Physiol. Rev. **6**, 426, 1926; *E. G. Montgomery*, Biochem. Journ. **19**, 71, 1925; dagegen *E. Gottlieb*, ebendaselbst **20**, 1, 1926; *W. Mozołowski* und *M. Taubenhaus*, diese Zeitschr. **181**, 85. 1927.

[2]) *Gad Andersen*, Journ. of biol. Chem. **39**, 267, 1919.

muskeln *niemals* einen postmortalen und auch niemals einen traumatischen Harnstoffschwund beobachtet haben. Wir haben den Harnstoffgehalt der Muskeln nach zwei unabhängigen Methoden bestimmt: nach dem Ureaseverfahren nach *Marshall*[1]) und nach *Sumner*[2]), bei welchem Urease zum zerriebenen Muskelgewebe hinzugefügt wird, und unter Kontrolle ohne Ureasezusatz das entstandene Ammoniak bestimmt: nach dieser Methode konnten wir in zerriebenen Muskeln, in welchen die traumatische — oder die traumatische und postmortale — Ammoniakbildung bereits abgelaufen war, nach kurzer Zeit das Ammoniak aus dem Harnstoff abspalten. Die zweite Methode war, was die Bestimmungsform anbetrifft, der Xanthydrolmethode von *André Boivin*[3]) nachgebildet; die Muskeln wurden mit Borat zerrieben, dann mit Eisessig auf 50proz. Essigsäure gebracht, mit *Tanret*schem Reagens enteiweißt und der Harnstoff als Dixanthylharnstoff abgeschieden: in dem abzentrifugierten und gewaschenen Niederschlag wurde dann der Harnstoffstickstoff bestimmt. Nach dieser Methode fanden wir keinen Unterschied im Harnstoff-N-Gehalt der Muskeln nach Ablauf der traumatischen und nach weit fortgeschrittener postmortaler Ammoniakbildung einerseits, in frischem, mit Borat fixiertem Gewebe andererseits. Ein Versuch sei hier angeführt:

Muskeln vom Oberschenkel eines Kaninchens, sofort nach der Schlachtung in Schnee angekühlt, in 20 Minuten der erste Wert bestimmt; dann in die Temperatur von 37° gebracht; zur Analyse wurden 1,2 bis 1,8 g Gewebe verwendet.

	$t = 0°$	$t = 37°$		
Zeit in Minuten	20	50	300	340
mg-Proz. NH_3-N mit Borat zerrieben	0,7	4,3	9,25	
„ „ „ Wasser „		8,2		9,9
„ Harnstoff-N	10,3	11,4	10,5	11,7

Wir sehen keinerlei Anhaltspunkte für die Annahme, daß im Wirbeltiermuskel eine Ureolyse stattfinde, und bestätigen die in der Einleitung erwähnten Ergebnisse von *Hoagland* und *Mansfield*[4]), die in großzügigen Versuchen die Konstanz des Harnstoffgehalts im Rindermuskel bei 37° nachgewiesen haben. Wir finden auch in der Literatur des Gegenstandes keinen Anhaltspunkt — außer in dem Versuch, in welchem *Murray Luck*[5]) in der Magenmucosa des Hundes, aber

[1]) *Marshall*, ebendaselbst 15, 493, 1913; *Marshall* und *Davies*, ebendaselbst 18, 53, 1914.
[2]) *Sumner*, ebendaselbst 27, 95, 1916.
[3]) *A. Boivin*, Bulletin de la Societé de Chimie biologique 8, 456, 1926.
[4]) *Hoagland* und *Mansfield*, Journ. of biol. Chem. 31, 487, 1917.
[5]) *M. Luck*, Biochem. Journ. 18, 814, 1924.

in keinem anderen Gewebe dieses Tieres eine Ureasewirkung nachgewiesen hat — für eine Harnstoffzerstörung im Organismus der Wirbeltiere und stehen bis auf weiteres auf demselben Standpunkt, den *Parnas* und *Heller*[1]) bei der Feststellung der Beständigkeit des Harnstoffs im Blute eingenommen haben, und den *Przyłęcki*[2]) auf Grund von Versuchen am ganzen Froschorganismus vertritt[3]).

2. Über die physiologische Bedeutung der Ammoniakbildung im Muskel.

Die Haupttatsachen über die Ammoniakbildung im Muskel, die hier zum ersten Male festgestellt werden, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

In den Skelettmuskeln der Vertreter aller Wirbeltierklassen ist ein chemisches System enthalten, welches sowohl auf adäquate funktionelle Reize als auch auf Verletzung der Muskelstruktur durch mechanische oder chemische Faktoren mit Abspaltung von Ammoniak reagiert.

Die Skelettmuskeln unterscheiden sich durch das Vorhandensein dieses Systems von allen anderen untersuchten Geweben, mit Ausnahme der glatten Muskeln und der Herzmuskeln, in welchen dieses System — wohl quantitativ schwächer — enthalten ist.

Die traumatische Ammoniakbildung, die 2,5 bis 6,5 mg Ammoniakstickstoff in 100 ccm Muskeln beträgt, stellt die obere Grenze derjenigen Ammoniakmenge dar, welche in Zusammenhang mit der Muskeltätigkeit in sehr kurzer Zeit — innerhalb von wenigen Minuten — entladen werden kann. Vergleicht man ihren Betrag mit dem der traumatischen Milchsäurebildung, die in der gleichen Zeit stattfindet,

---

1) *Parnas* und *Heller*, diese Zeitschr. **152**, 1, 1924; **155**, 247, 1925.

2) *Przyłęcki*, Arch. intern. de Physiol. **24**, 13, 1924; **24**, 281, 1925; **25**, 45, 1925.

3) *Nachtrag während der Korrektur*: *Embden* (Klin. Wochenschr. **6**, 628, 2. April 1927) sieht in einer eben erschienenen Mitteilung die Adenylsäure als Muttersubstanz des Muskelammoniaks an; er stützt sich dabei auf die Feststellung, daß Adenosinphosphorsäure im Muskel vorkommt und im Muskelbrei der Desaminierung unterliegt. Diese Vorstellung ist mit den *vorliegenden* Angaben über den Puringehalt des Muskels schwer in Einklang zu bringen. Um die traumatische Bildung von 5 mg-Proz. Ammoniakstickstoff allein zu decken, müßte der Gehalt an Adenylsäure im Froschmuskel 25 mg-Proz. Purinstickstoff entsprechen, während für den *gesamten* Purinstickstoff des Froschfleisches 35 mg-Proz. angegeben werden. Auch für andere Muskelarten führt die Annahme von *Embden* zu dem Schluß, daß fast der gesamte Purinstickstoff in Form von Adenylsäure bzw. Inosinsäure vorhanden sein müßte, falls die Adenylsäure die Muttersubstanz des Ammoniaks darstellt. Dieser Schluß müßte durch Bestimmung der Purinverteilung im Muskel geprüft werden, wenn der oben bezeichnete Widerspruch aufgeklärt werden soll.

und die wir mit — hoch gerechnet — 200 mg-Proz. ansetzen wollen, so verhält sich die Ammoniakabspaltung von 4 mg-Proz., oder rund 0,3 Millimol-Proz., zu der Milchsäurebildung von rund 2,2 Millimol-Proz. abgerundet wie 10 bis 15 zu 100; sie hat also eine bedeutende, physiologisch sehr in Betracht kommende Größe, und ihr Verhältnis zum Kohlehydratschwund und zur Milchsäurebildung ist von ähnlicher Ordnung, wie die des Stickstoffumsatzes zu dem Umsatz der stickstofffreien Kohlenstoffverbindungen des Organismus.

Betrachtet man die Ammoniakabspaltung bei der Ermüdung und vergleicht den Wert von 2 mg-Proz. oder $^1/_7$ Millimol-Proz. mit der Menge der Glucoseäquivalente, die bei vollständiger Ermüdung verschwinden (etwa 250 mg-Proz. oder rund 1,4 Millimol-Proz.), so ergeben sich für die abgespaltenen Stickstoffäquivalente rund 5 Proz. der Glucoseäquivalente. Zieht man aber die Erholungsvorgänge mit in Betracht und nimmt nach *Meyerhof* und *Hill* an, daß etwa vier Fünftel der Milchsäure wieder zu Glucose aufgebaut werden, so ist das Verhältnis der Äquivalente Ammoniakbildung : Glucoseschwund gleich 1 : 2.

Zieht man noch diejenige Ammoniakbildung in Betracht, die im Warmblütermuskel so hohe Beträge annimmt, und die wir hier als postmortale bezeichnet haben, so wird man dem Stoffwechsel stickstoffhaltiger Substanzen im Muskel eine bedeutendere Rolle beimessen müssen, als auf Grund der vorhandenen Kenntnisse von den chemischen Vorgängen im Muskel bis jetzt geschehen ist.

Die Bereitschaft des Skelettmuskels zu einer plötzlichen Entladung bedeutender Ammoniakmengen; die postmortale Anhäufung von Ammoniak im Muskel unter Erhaltung des ammoniakbildenden Systems; die Anhäufung von Ammoniak im ermüdeten Muskel sowohl in vivo als auch im isolierten Organ; schließlich die Anhäufung des Ammoniaks in Starrezuständen; diese Tatsachen scheinen gewichtig genug, um dem ammoniakabspaltenden Vorgang eine wesentliche Rolle im chemischen Geschehen des Muskels zumuten zu dürfen.

Vergleicht man die Ammoniakbildung in verschiedenen Muskeln, so fällt es auf, daß die Intensität dieses Vorgangs — an der Größe der Bereitschaft zur traumatischen oder der Intensität der „postmortalen“ Ammoniakbildung gemessen — mit der Funktion des Muskels zusammenhängt. Sie ist größer in den schnellen weißen Muskeln als in den roten, wie der Vergleich der Brustmuskeln und der Schenkelmuskeln der Taube zeigt: die traumatische Bereitschaft fehlt in langsamen, periodisch arbeitenden Herzmuskeln der Sumpfschildkröte und des Kaninchens, sie ist dagegen vorhanden im Herz der Taube, bei der mit der Flugleistung eine sehr viel höhere Beanspruchung des Herzens als in der Ruhe vorkommen kann.

Mit den herrschenden, auf die Forschungen von *Fletcher* und *Hopkins* bis *Hill* und *Meyerhof* aufgebauten Kenntnissen von dem Stoffwechsel des Muskels können wir die hier mitgeteilten Tatsachen noch nicht in ein Bild zusammenfügen. Es erscheint nicht wahrscheinlich, daß der ammoniakbildende Vorgang als eine energieliefernde Reaktion in Frage kommt: wir glauben eher, daß er in den Mechanismus der Umsetzung chemischer Energie in mechanische gehört.

Zusammenfassung.

1. Wenn man einen Wirbeltiermuskel mit Wasser oder physiologischer NaCl-Lösung zerreibt, so bilden sich darin sofort Ammoniakmengen von der Größenordnung von Milligrammen in 100 mg Muskel.

2. Diese traumatische Ammoniakbildung läßt sich verhindern, wenn man den Muskel mit einer Boratlösung von $p_H = 9{,}3$ zerreibt.

3. Auf Grund dieser Feststellung wird eine Methode zur Bestimmung des Ammoniakgehalts der Muskeln und anderer Gewebe ausgearbeitet.

4. Die traumatische Ammoniakbildung wird in allen Klassen von Wirbeltieren untersucht und in den Skelettmuskeln überall gefunden.

5. Sie fehlt bei Drüsen, ist aber, im schwächeren Maße als in den Skelettmuskeln, in glatten Muskeln (Magen) und Herzmuskeln festzustellen.

6. Die traumatische Ammoniakbildung im Froschmuskel ist ein schnell verlaufender Vorgang, der nach 90 Sekunden im Froschgastrocnemius zu Ende kommt.

7. Das ammoniakbildende System läßt sich durch die alkalische Boraxlösung aus dem Gewebe extrahieren und durch Neutralisation wieder aktivieren. Die Muttersubstanz des Ammoniaks geht dabei in Lösung, mit ihr auch ein Teil des Ferments, im unlöslichen Rückstand bleibt nichts von der ammoniakbildenden Substanz, wohl aber ein großer Teil des Ferments.

8. Im Muskelgewebe ist die ammoniakbildende Substanz und das sie zersetzende Ferment zu einem durch die Zellstruktur funktionell zusammengefügten System vereinigt, in welchem der Vorgang der Ammoniakbildung mit viel größerer Geschwindigkeit vor sich geht, als in der Lösung beider Bestandteile.

9. Es wird festgestellt, daß Anoxybiose keinen Einfluß auf die Ammoniakanhäufung im Muskel in vivo hat.

10. Erfrieren des Gewebes beschleunigt die Ammoniakanhäufung im Muskel.

11. *Wärmestarre* und *Coffeinstarre* sowie Chloroformstarre, im schwächeren Maße die Wasserstarre, bedingen einen ähnlichen Effekt, wie die mechanische Zerstörung des Gewebes.

12. Im intakten Muskel findet nach seiner Isolierung eine bedeutende Anhäufung von Ammoniak statt; dieselbe wird in Muskeln verschiedener Art und verschiedener Tierklassen untersucht.

13. Dabei wird gefunden, daß in Fischmuskeln die Ammoniakbildung ausschließlich auf Kosten des zur traumatischen Reaktion bereitstehenden ammoniakbildenden Systems stattfindet, während beim Frosch und bei der Schildkröte in niedrigen Temperaturen (12°) das ammoniakbildende System lange erhalten bleibt. Im Muskel von Warmblütern ist die postmortale Ammoniakbildung viel intensiver als bei Kaltblütern, das auf traumatische Reize reagierende System sehr unbeständig.

14. Anwesenheit oder Abwesenheit von Sauerstoff hat für die Vorgänge der Ammoniakanhäufung keinen Einfluß.

15. Ermüdung durch elektrische Reizung oder durch Strychninkrämpfe hat eine Anhäufung von Ammoniak im Gewebe zur Folge; die Ammoniakbildung im Muskel ist ein mit der Muskeltätigkeit verknüpfter Vorgang.

16. Mit den Schwankungen des Ammoniakgehalts der Muskeln gehen keine Schwankungen des Harnstoffgehalts zusammen.

Über den Einfluß einiger Fraktionen des Fleischextraktes auf die Absonderung des Pankreassaftes und der Galle.

Von

R. Krimberg und S. A. Komarow.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Riga.)

(Eingegangen am 18. März 1927.)

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit konnten wir zeigen, daß dem Methylguanidin in hohem Grade die Fähigkeit eigen ist, die Absonderung des Pankreassaftes und der Galle hervorzurufen und unter Umständen dieselbe sogar für mehrere Stunden im Gange zu erhalten[1]). Da das Methylguanidin bekanntlich auch im lebenden Muskel in recht bedeutender Menge enthalten, und da sein Vorkommen im Blute ebenfalls sichergestellt ist, so hielten wir uns für um so mehr berechtigt, diesem in sehr verschiedener Richtung äußerst aktiven Muskelhormon auch im physiologischen Absonderungsprozeß des Pankreassaftes und der Galle während der Verdauung eine Rolle zuzuschreiben.

Die bis jetzt nachgewiesenen Muskelhormone besitzen die Eigenschaften organischer Basen und sind bekanntlich im Phosphorwolframsäureniederschlag des Fleischextrakts enthalten. Um zu sehen, ob in diesem Niederschlag außer dem Methylguanidin auch noch nicht andere bekannte (Carnosin, Cholin, Carnitin) oder zurzeit noch unbekannte Hormone vorkommen, welche einen sekretionserregenden Einfluß auf die Pankreasdrüse und die Leber auszuüben imstande wären, wurde derselbe von uns einer näheren physiologischen Prüfung unterzogen. Zu diesem Zwecke wurde der genannte Niederschlag nach Abtrennung der Phosphorwolframsäure fraktioniert, die erhaltenen stark alkalisch reagierenden Fraktionen neutralisiert (fast immer mit Salzsäure), sterilisiert und in vivisektorischen Versuchen an Hunden auf ihre eventuelle Fähigkeit die Absonderung des Pankreassaftes und der Galle hervorzurufen bzw. zu verstärken geprüft. Die Art der operativen Vorbehandlung der Tiere, sowie die Ausführung der Versuche selbst, war genau dieselbe, wie in unserer oben zitierten Arbeit beschrieben.

---

[1]) *R. Krimberg* und *S. A. Komarow*, diese Zeitschr. **176**, **73**, **1926**.

Fraktionierungsmethode der Fleischextrakte.

Als Ausgangsmaterial für die Versuche wurden aus ganz frischem Rindfleisch gewonnene Extrakte und der *Liebig*sche Fleischextrakt verwendet. Die Darstellung der Extrakte aus frischem Fleisch geschah wie von uns in einer anderen ebenfalls vor kurzem erschienenen Arbeit angegeben[1]). Die Fraktionierung der Extrakte (auch des *Liebig*schen) wurde aber im großen und ganzen nach dem ursprünglich von einem von uns beschriebenen Verfahren durchgeführt[2]). Es wurden auf solche Weise die folgenden Fraktionen der im Phosphorwolframsäureniederschlag enthaltenen basischen Stoffe dargestellt: 1. eine Purinfraktion; 2. eine Carnosinfraktion; 3. eine Methylguanidinfraktion; 4. eine Carnitinfraktion und endlich 5. eine aus dem Filtrat nach der Abscheidung der Carnitinfraktion erhaltene „Restfraktion". Um auch das genannte letzte Filtrat zur intravenösen Applikation verwendbar zu machen, wurde zwecks Ausfällung der Carnitinfraktion nach der Angabe von *Smorodinzew*[3]) anstatt der Kaliumwismutjodidlösung eine Natriumwismutjodidlösung benutzt, das Filtrat mit frisch gefälltem Bleihydroxyd zerlegt, das neue Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt, abermals filtriert und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Der Niederschlag wurde auf die übliche Weise mit Bariumhydroxyd zerrieben, das Filtrat vom Barium befreit, mit Salzsäure neutralisiert, bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit 95proz. Alkohol extrahiert, der nach vollständiger Entfernung des Alkohols hinterbliebene neue Rückstand in wenig Wasser gelöst, die Lösung sterilisiert und den Versuchshunden eingeführt. In den Versuchsprotokollen wird diese Lösung, wie schon erwähnt, als „Restfraktion" genannt.

Die auf die soeben angegebene Weise erhaltenen und in unseren Versuchen zwecks Einverleibung angewandten Fraktionen des Fleischextraktes sind in den unten angeführten Versuchsprotokollen als nach dem „ursprünglichen" Verfahren dargestellte bezeichnet. Außer der soeben angegebenen Fraktionierungsmethode haben wir jedoch zu demselben Zwecke auch noch eine andere, kürzere benutzt, wobei die nach dieser letzteren Methode erhaltenen Fraktionen in unseren Versuchsprotokollen als nach dem „reduzierten" Verfahren dargestellte vermerkt sind. In der Mehrzahl unserer Tierversuche sind gerade die

---

[1]) *R. Krimberg* und *S. A. Komarow*, diese Zeitschr. 171, 171, 1926.

[2]) *R. Krimberg*, Über die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Muskeln. Inaug.-Diss., S. 115ff. Moskau 1907. Hoppe-Seyler-Thierfelders Handb. d. physiol.-chem. Analyse 1909, S. 758.

[3]) *J. A. Smorodinzew*, Berichte d. Kais. Akademie d. Wiss., S. 1541. St. Petersburg 1916.

nach dem „reduzierten" Verfahren gewonnenen Fraktionen des Fleischextrakts angewandt worden. Bei dieser Bearbeitungsweise haben wir die anfängliche Reinigung der Extraktlösungen mittels Bleiacetat, sowie das Einengen des nach der Abscheidung der Carnosinfraktion erhaltenen Filtrats in Gegenwart von Magnesiumoxyd ganz weggelassen. Der Hauptunterschied aber besteht darin, daß wir bei diesem Verfahren auf die Isolierung einer gesonderten Methylguanidinfraktion verzichtet haben aus dem Grunde, weil bei der Fraktionierung nach dem „ursprünglichen" Verfahren das Methylguanidin niemals in seiner ganzen Menge in die eigentliche Methylguanidinfraktion übergeführt, sondern teilweise in der Carnosinfraktion, teilweise aber auch in der Carnitinfraktion angetroffen wird; andererseits ist auch das Carnosin niemals in seiner ganzen Menge in der eigentlichen Carnosinfraktion enthalten, sondern zum Teil, und wie dies mehrfach ausgeführte Nachprüfungen gezeigt haben, nicht selten sogar in recht bedeutenden Mengen in die Methylguanidin- und in die Purinfraktion übergeht. Aus diesem Grunde schien es uns als zweckmäßig, bei der Fraktionierung der Fleischextrakte derart vorzugehen, daß die Carnosinfraktion und die Methylguanidinfraktion nicht getrennt, sondern zusammen als eine Carnosin-Methylguanidinfraktion erhalten werden könnten. Es schien uns dies um so mehr zulässig, als es sich schon vorher erwiesen hatte, daß das Carnosin, welches ja doch den Hauptteil der Carnosinfraktion ausmacht, als solches weder auf die Pankreasdrüse noch auf die Leber irgendwelchen merkbaren sekretionserregenden Einfluß auszuüben imstande ist.

In der Absicht also, eine gemeinsame Carnosin-Methylguanidinfraktion zu erhalten, wurde das nach Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlags erhaltene Filtrat mittels Schwefelsäure und Kohlensäure vom Baryt befreit, abermals filtriert, mit konzentrierter Salpetersäure bis zur schwach sauren Reaktion auf Lackmus versetzt und stark eingeengt, wonach zu der abgekühlten Flüssigkeit nochmals Salpetersäure bis zur schwach positiven Reaktion auf Kongo hinzugefügt wurde. Hierauf wurde nun die Flüssigkeit mit 20proz. Silbernitratlösung bis zu einem bedeutenderen Überschuß an Silber (bei Ausführung der *Kossel*schen Probe auf einem Uhrglase sofort ein dunkelbrauner Niederschlag) versetzt und über Nacht im Eisschrank stehengelassen. Der Niederschlag der Purinbasen wurde am anderen Tage scharf abgesaugt, und das Filtrat mit warmgesättigter Bariumhydroxydlösung unter Verwendung eines größeren Überschusses (bis zur Bildung einer deutlichen Haut auf der Flüssigkeitsoberfläche) unter Kühlung ausgefällt. Es erwies sich, daß unter den soeben angegebenen Bedingungen im Filtrat von dem auf solche Weise erhaltenen Silberbarytniederschlag höchstens Spuren von Carnosin oder eventuell anderen Imidazolkörpern zurückbleiben, und daß jedenfalls auch bei weitem der größte

Teil des Methylguanidins in diesem Niederschlag enthalten ist. Während der Tierversuche, in welchen die aus dem Filtrat vom Silberbarytniederschlag gewonnenen Fraktionen, also die Carnitinfraktion und die Restfraktion einverleibt worden waren, konnten allerdings keine deutlicheren Erscheinungen wahrgenommen werden, welche an die scharf ausgeprägten und charakteristischen Symptome der Methylguanidinwirkung zu erinnern geeignet wären.

Tierversuche.

Die *Fraktion der Purinbasen* erwies sich in drei Versuchen entweder als ganz inaktiv oder vielleicht nur äußerst wenig aktiv (in einem nicht ganz deutlichen Versuch) sogar in Gaben, welche etwa einem Kilogramm frischen Fleisches oder etwa 30 g *Liebig*schen Fleischextrakts entsprechen, nicht nur in bezug auf die Pankreassekretion, sondern auch in bezug auf die Exkretion der Galle.

Die nach dem „ursprünglichen" Verfahren gewonnene *Carnosinfraktion* und ganz besonders die nach dem „reduzierten" Verfahren erhaltene *Carnosin-Methylguanidinfraktion* des Fleischextrakts erwiesen sich dagegen als *in bedeutendem Maße aktiv.*

Aus Versuch 3, in welchem eine nach der „ursprünglichen" Methode gewonnene und etwa 70 g frischen Fleisches entsprechende Carnosinfraktion einverleibt wurde, sieht man vollständig klar, erstens, daß sogar eine so geringe Menge Fleisch wie die eben erwähnte schon genügend viel aktive Stoffe enthält, um eine deutliche Steigerung der Pankreassekretion zu bewirken, und zweitens, daß die aktive Substanz in keinem Falle das Carnosin sein kann. In der Tat, unter allen Versuchen, in welchen reines Carnosin appliziert wurde, ist der Versuch 3 der einzige, wo nach Injektion einer Carnosingabe von 0,4 g eine gewisse Steigerung der Pankreassekretion beobachtet wurde. Als aber gleich nachdem eine Gabe der Carnosinfraktion eingeführt wurde, welche nur 0,18 g, also mehr als zweimal weniger Carnosin enthielt, so war die darauf abgesonderte Menge des Pankreassaftes aber nicht kleiner, wie man zu erwarten hätte, falls die in der einverleibten Fraktion enthaltene aktive Substanz das Carnosin wäre, sondern sogar eine etwas größere.

Die Aktivität der nach dem „reduzierten" Verfahren gewonnenen *Carnosin-Methylguanidinfraktion* wurde in drei Versuchen geprüft, von welchen zwei (Versuche 6 und 7) unten in Protokollform angeführt sind. Aus allen diesen Versuchen erhält man den Eindruck, daß die excitosekretorische Wirkung dieser Fraktion des Fleischextrakts eine größere ist, als diejenige der nach dem „ursprünglichen" Verfahren erhaltenen Carnosinfraktion. Aus den angeführten Versuchen sieht man deutlich,

daß eine Gabe dieser Fraktion, welche nur etwa 150 g frischen Fleisches oder nur etwa 7,5 g *Liebigs* Extrakt entspricht, schon eine recht bedeutende Steigerung nicht nur der Pankreassekretion, sondern auch der Gallenexkretion verursacht. Die Steigerung der Pankreassekretion beginnt ebenso wie bei Anwendung des Sekretins nach einer Latenzperiode von 1 bis 2 Minuten und erreicht ihr Maximum schon während der ersten 5 bis 10 Minuten nach der Injektion; dann wird die Sekretion allmählich schwächer und kehrt nach etwa 35 bis 45 Minuten wieder zur eventuellen sehr spärlichen Vorversuchsnorm zurück. In bezug auf die Exkretionssteigerung der Galle kann eine scharf abgegrenzte Latenzperiode natürlich kaum angegeben werden; ihr Maximum erreicht dieselbe aber während der ersten oder zweiten Viertelstunde nach der Injektion und dauert im ganzen ebenfalls etwa drei Viertelstunden.

Was die Natur der in diesen Fraktionen enthaltenen excitosekretorisch wirksamen Hormone anbelangt, so kann über dieselbe zurzeit nichts Bestimmtes ausgesprochen werden. Da aber gerade in diesen Fraktionen das Methylguanidin und in der nach dem „reduzierten“ Verfahren gewonnenen Carnosin-Methylguanidinfraktion sogar die Hauptmenge desselben enthalten ist, so liegt wohl die Vermutung nahe, daß dieses höchst aktive Hormon möglicherweise hier eine ausschlaggebende Rolle spielen könnte.

Die Wirkung der *Methylguanidinfraktion* auf die Absonderung des Pankreassaftes und der Galle erinnert, wie aus dem Versuchsprotokoll 12 zu ersehen ist, ganz und gar an die von uns schon früher an anderer Stelle[1]) ausführlich beschriebene Wirkung des Methylguanidins selbst. In dem soeben erwähnten Versuch 12 wurde eine nach dem „ursprünglichen“ Verfahren aus 8,3 kg frischen Fleisches gewonnene Methylguanidinfraktion geprüft. Dem Hunde wurde ein Teil dieser Fraktion, welcher nur 332 g frischen Fleisches entsprach, injiziert. Der geringen Quantität der einverleibten Fraktion gemäß war die Steigerung der Pankreassekretion keine besonders große, obwohl jedoch eine vollständig deutliche; die Gallenexkretion dagegen erfuhr eine sehr wesentliche Verstärkung. Wie für das Methylguanidin charakteristisch, trat auch hier eine bedeutendere Verstärkung der Absonderungen nicht gleich nach der Injektion ein, sondern erst allmählich, um dafür sich aber längere Zeit, während etwa 2 Stunden, auf gewisser Höhe zu erhalten.

Außer den soeben besprochenen Fraktionen des Fleischextrakts, deren Hauptbestandteile das Carnosin und das Methylguanidin sind, wurde von uns, wie schon vorher erwähnt, auch noch das *Carnosin*

---

[1]) *R. Krimberg* und *S. A. Komarow*, diese Zeitschr. **176**, 73, 1926.



als solches in fünf vivisektorischen Versuchen (mit zehn Injektionen) geprüft. Zur Einverleibung wurde ein sorgfältig gereinigtes Carnosinpräparat (F. 249 bis 250° C unter Zersetzung) als Chlorid gewöhnlich in 5proz. Lösung und in Gaben von 0,84 bis 0,06 g (gleich 70 bis 12 mg Carnosin pro Kilogramm Körpergewicht) benutzt. In allen hierzu gehörenden Versuchen, nur mit Ausnahme des Versuchs 3, von welchem schon oben kurz die Rede war, ergab es sich, daß das Carnosin als solches unter den angegebenen Versuchsbedingungen keine merkbare Steigerung weder der Pankreassekretion noch der Gallenexkretion zu bewirken imstande ist, obwohl das Carnosin in denselben hier angeführten Gaben pro Kilogramm Körpergewicht appliziert, nach unseren wiederholten Beobachtungen auf die Magen- und Darmdrüsen dagegen stets sehr deutlich sekretionserregend wirkt.

Die *Carnitinfraktion*, sowohl die nach dem „ursprünglichen“ als auch die nach dem „reduzierten“ Verfahren erhaltene, erwies sich in bezug auf die Absonderung des Pankreassaftes als sehr wenig aktiv. Nach einer Latenzperiode von 2 bis 12 Minuten trat wohl immer eine wenig merkbare Steigerung der Pankreassekretion ein; dieselbe verblieb aber auf sehr niedrigen Zahlen und dauerte nur etwa 10 bis 30 Minuten. In einigen Versuchen (z. B. 9 und 10) rief die Carnitinfraktion eine recht bedeutende Steigerung der Gallenexkretion hervor, in der Mehrzahl der Versuche wurde dieselbe jedoch vermißt. Die minimale, auf die Pankreasdrüse eben noch wirksame Gabe dieser Fraktion scheint etwa 400 bis 500 g frischen Fleisches bzw. etwa 20 g Liebigsextrakt zu entsprechen.

Was endlich die *Restfraktion* anbelangt, so ist dieselbe ohne Zweifel inaktiv in bezug auf die Gallenexkretion und möglicherweise schwach aktiv in bezug auf die Absonderung des Pankreassaftes, wobei die minimale, eben noch wirksame Gabe dieser Fraktion etwa 1 kg frischen Fleisches oder 40 bis 50 g Liebigsextrakt entsprechen dürfte.

Es geht aus den oben angeführten, wir möchten sagen, ziemlich umfangreichen Tierversuchen also hervor, daß bei weitem der größte Teil der im Phosphorwolframniederschlag des Fleischextrakts enthaltenen physiologisch aktiven Stoffe, welche auf humoralem Wege eine sichere Steigerung sowohl der Sekretion des Pankreassaftes, als auch der Gallenexkretion hervorzurufen imstande sind, durch die kombinierte Anwendung von Silbernitrat und Bariumhydroxyd abgeschieden wird und in die Carnosin-Methylguanidinfraktion übergeht. Der excitosekretorisch wirkende Stoff ist in diesem Falle aber sicher nicht das Carnosin, sondern andere in der genannten Fraktion vorkommende Körper, unter welchen das Methylguanidin wohl die Hauptrolle spielen dürfte. Vor allem geht es aber auch aus dieser Arbeit hervor, daß *das*

Muskelsystem als ein wichtiger Ort im Körper angesehen werden muß, an welchem excitosekretorische Hormone u. a. auch für die Pankreasdrüse und die Leber produziert werden. Wir sind also der Überzeugung, daß die Hormone des Muskelsystems auch unter physiologischen Verhältnissen an der Arbeit der genannten Drüsen als stimulierende Substanzen teilnehmen.

Wie bekannt, liefert die nach *Bayliss* und *Starling* mit Salzsäure aufgekochte Darmschleimhaut erhebliche Mengen eines Sekretins, welches sehr stark und sicher auf die Pankreasdrüse und zum Teil auch auf die Leber excitosekretorisch einwirkt, und dessen auch wir uns in allen unseren Versuchen zwecks Kontrolle und gewissermaßen zwecks Vergleichung der Wirkungsstärke der von uns einverleibten Fraktionen des Fleischextrakts bedient haben. Da wir aber einerseits die in einer Sekretinlösung enthaltenen aktiven Stoffe in reinem Zustande nicht kennen, und da andererseits die chemische Zusammensetzung der von uns angewandten Fraktionen ebenfalls nicht ganz genau bekannt ist, so kann hier von einem Vergleich im Sinne strenger Gewichtsmengen der einverleibten aktiven Substanzen natürlich nicht die Rede sein. Es ist aber durchaus möglich, über den relativen excitosekretorischen Wert des Sekretins und der einzelnen Fraktionen des Fleischextrakts für den Organismus eine gewisse, wenn auch nur grobe Vorstellung zu gewinnen, wenn man auf Grund der in einem Versuch abgesonderten Mengen des Pankreassaftes die zu erwartenden Mengen desselben berechnet, in der Voraussetzung, daß einverleibt worden wäre, einerseits, die ganze Menge des in der Darmschleimhaut des Versuchstieres enthaltenen Sekretins und, andererseits, die ganze im Muskelsystem des Versuchstieres enthaltene Menge irgend einer im Versuch angewandten Fraktion des Fleischextrakts.

Nehmen wir als Beispiel den unten angeführten Versuch 6, in welchem einem Hunde von 12 kg Körpergewicht 10 ccm Darmsekretin und nachher 10 ccm einer Lösung der nach dem „reduzierten" Verfahren aus frischem Fleisch gewonnenen Carnosin-Methylguanidinfraktion einverleibt wurden. Zur Darstellung des Sekretins wurde von uns gewöhnlich außer der Duodenalschleimhaut auch noch diejenige der oberen Hälfte des Dünndarms benutzt, und wir schätzen das Gewicht der von einem 12 kg schweren Hunde aus den genannten Darmteilen erhaltbaren Schleimhaut auf etwa 25 g. Die letztere wurde nach dem bekannten Verfahren von *Bayliss* und *Starling* unter Anwendung der vierfachen Menge n/10 Salzsäure auf Sekretin verarbeitet, so daß die ganze Menge der am Ende erhaltenen Sekretinlösung also etwa 100 ccm betragen haben dürfte. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, reagierte der Hund in unseren Versuchsbedingungen auf Einverleibung von 10 ccm des Darmsekretins mit Absonderung von 2,9 ccm Pankreassaft,

folglich hätte man nach Einverleibung der ganzen Sekretinmenge also eine Absonderung von 29 ccm Pankreassaft zu erwarten. Andererseits kann das Gewicht der Muskeln eines 12 kg schweren Hundes auf etwa 4 kg geschätzt werden. Wie aus der Tabelle ebenfalls zu ersehen ist, reagierte der Hund auf Einverleibung von 10 ccm einer Lösung der Carnosin-Methylguanidinfraktion des Fleischextrakts mit Absonderung von 0,45 ccm Pankreassaft; da aber die eingeführte Gabe dieser Fraktion, wie in der Tabelle angegeben, nur etwa 149 g frischen Muskelgewebes entsprach, so hätte man nach Einverleibung der ganzen Menge der im Muskelsystem des Versuchshundes enthaltenen Carnosin-Methylguanidinfraktion die Absonderung von etwa 12,1 ccm Pankreassaft erwarten müssen. Folglich ist der excitosekretorische Wert der in den Muskeln enthaltenen Carnosin-Methylguanidinfraktion schon allein nur etwa 29 : 12,1 = *2,4mal* kleiner als derselbe Wert des in der Darmschleimhaut enthaltenen pankreatischen Sekretins.

Versuchsprotokolle.

Abkürzungen in den Tabellen: Inj. = Injektion; M. = frische Muskeln; Le = *Liebigs*extrakt; N = Stickstoff; Cns = Carnosin; CnsF. = nach dem „ursprünglichen“ Verfahren dargestellte Carnosinfraktion; CnsF.r. = nach dem „reduzierten“ Verfahren dargestellte Carnosin-Methylguanidinfraktion; CntF.r. = nach dem „reduzierten“ Verfahren dargestellte Carnitinfraktion; MgF. = nach dem „ursprünglichen“ Verfahren dargestellte Methylguanidinfraktion; RF.r. = nach dem „reduzierten“ Verfahren dargestellte Restfraktion. PurF.r. = nach dem „reduzierten“ Verfahren dargestellte Purinfraktion.

Versuch 3.

Hund, 9 kg, ♂. Um 8½ Uhr morgens 0,09 g Morphin. hydrochl. subkutan. Operation von 10 bis 10½ Uhr.

Zeit	Pankreassekretion ccm	Zeit	Pankreassekretion ccm
11h43′	Inj. 12 ccm Sekretin	12h28′	0,08
11 45	↗	12 33	0,02
11 50	1,50	12 38	0
11 55	1,00	12 43	0
12 00	0,40	12 45	Inj. 5 ccm CnsF.r. = 70 g M;
12 05	0,25		51 mg N; 180 mg Cns.
12 10	0,09	12 46½	↗
12 15	0,06	12 52	0,06
12 20	0,03	12 57	0,04
12 21	Inj. 0,4 g Carnosin	1 02	0,01
	(5proz. Lösung)	1 07	0,005
12 23	↗	1 22	0

Versuch 6.

Hund, 12 kg, ♀. Um 8½ Uhr morgens 0,12 g Morphin. hydrochl. subkutan. Operation von 11 bis 12 Uhr.

Zeit	Pankreassekretion ccm	Gallensekretion ccm
1h03'	Inj. 10 ccm Sekretin	
1 05	↗	↗
1 20	2,75	2,3
1 35	0,11	1,2
1 50	0,03	0,7
2 05	0,01	0,7
2 06	Inj. 10 ccm CnsF.r. = 149 g M; 132 mg N; 352 mg Cns.	
2 07	↗	+
2 22	0,34	1,1
2 37	0,05	1,6
2 52	0,03	1,0
3 07	0,02	0,6
3 22	0,01	0,5
3 22	Inj. 10 ccm CnsF.r. = 7,47 g Le; 155 mg N; 340 mg Cns	
3 24	↗	+
3 39	0,15	1,1
3 54	0,07	1,1
4h09'	0,01	0,7
4 22	0	0,6
4 22	Inj. 10 ccm CntF.r. = 22,2 g Le; 231 mg N	
4 24	↗	+
4 29	0,02	0,2
4 34	0,03	0,2
4 39	0,01	0,2
4 54	0,01	0,2
4 54	Inj. 20 ccm CntF.r. = 44,4 g Le; 462 mg N	
5 09	0,17	0,5
5 24	0,08	0,3
5 39	0,02	0,4
5 54	0,01	0,3
6 00	Obduktion: im Magen 120 ccm Flüssigkeit (Gesamtacidität = 69, freie Salzsäure = 42)	

Versuch 7.

Hund, 8 kg, ♀. Um 8 Uhr morgens 0,1 g Morphin. hydrochl. subkutan. Operation von 9½ bis 10½ Uhr.

Zeit	Pankreassekretion ccm
12h00'	Inj. 10 ccm Sekretin
12 02	↗
12 17	1,82
12 32	0,08
12 47	0,02
12 47	Inj. 10 ccm CnsF.r. = 7,47 g Le; 155 mg N; 340 mg Cns.
12 49	↗
1 04	0,43
1 19	0,05
1 34	0,02
1 36	Inj. 10 ccm CnsF.r. = 149 g M; 132 mg N; 352 g Cns.
1 37	↗
1 52	0,26
2 07	0,04
2 22	0,02
2 23	Inj. 10 ccm CntF.r. = 22,2 g Le; 231 mg N
2 25	↗
2 40	0,06
2 55	0,02
3h00'	0
3 00	Inj. 10 ccm CntF.r. = 475 g M; 243 mg N
3 15	0,02
3 20	0
3 20	Inj. 20 ccm CntF.r. = 950 g M; 486 mg N
3 27	↗
3 35	0,04
3 50	0,02
4 05	0,01
4 20	0,01
4 20	Inj. 10 ccm RF.r. = 45 g Le; 65,8 mg N
4 35	0,02
4 50	0,03
5 05	0,01
5 05	Inj. 10 ccm RF.r. = 950 g M; 47,6 mg N
5 20	0,03
5 35	0,01
5 50	0,01

Versuch 9.

Hund, 4 kg, ♂. Um 8½ Uhr morgens 0,06 g Morphin. hydrochl. subkutan. Operation von 10¾ bis 11½ Uhr morgens.

Zeit	Pankreas-sekretion ccm	Gallen-sekretion ccm	Zeit	Pankreas-sekretion ccm	Gallen-sekretion ccm
12h15'	Inj. 10 ccm Sekretin		3h04'	Inj. 10 ccm RF.r. = 45 g Le; 65,8 mg N	
12 17	↗	↗	3 19	0,055	0,5
12 32	0,93	0,70	3 34	0,045	0,5
12 47	0,04	0,84	3 49	0,035	0,5
1 02	0,005	0,85	4 04	0,03	0,5
1 04	Inj. 10 ccm CntF.r. = 475 g M; 243 mg N		4 19	0,03	0,3
1 09	↗	+	4 34	0,025	0,3
1 19	0,07	0,95	4 40	Inj. 10 ccm PurF.r. = 950 g M; 66,5 mg N	
1 34	0	1,30	4 55	0	0,3
1 49	0,04	0,75	5 10	0,03	0,3
2 04	0	0,70	5 25	0,02	0,35
2 19	0	1,10	5 25	Inj. 10 ccm Sekretin	
2 34	0,035	0,70	5 27	↗	+
2 49	0,02	0,50	5 40	1,30	0,55
3 04	0,015	0,60	5 50	0,10	+
			5 55	0	0,40

Versuch 10.

Hund, 9½ kg, ♀. Um 8¼ Uhr morgens 0,08 g Morphin. hydrochl. subkutan. Operation von 10½ bis 11½ Uhr.

Zeit	Pankreas-sekretion ccm	Gallen-sekretion ccm	Zeit	Pankreas-sekretion ccm	Gallen-sekretion ccm
12h15'	Inj. 10 ccm Sekretin		3h08'	0,01	1,1
12 17	↗	↗	3 08	Inj. 10 ccm CntF.r. = 475 g M; 243 mg N	
12 32	1,40	0,3	3 23	0,005	0,75
12 47	0,02	1,2	3 38	0,005	0,75
1 02	0,01	0,3	3 40	Inj. 10 ccm PurF.r. = 950 g M;	
1 02	Inj. 10 ccm CntF.r. = 475 g M; 243 mg N		3 55	0	0,7
1 17	0,01	0,5	4 10	0,02	0,9
1 32	0	0,1	4 25	0,01	0,6
1 47	0	0,75	4 40	0,01	0,5
2 02	0	0,75	4 55	0,01	0,7
2 15	0	0,75	5 10	0,01	0,5
2 23	Inj. 10 ccm Sekretin		5 25	0,01	0,5
2 38	1,60	0,4	5 40	0	0,5
2 53	0,05	0,7			

Versuch 12.

Hund, 4 kg, ♂. Um 8½ Uhr morgens 0,08 g Morphin. hydrochl. subkutan. Operation von 10 bis 10½ Uhr.

Zeit	Pankreas-sekretion ccm	Gallen-sekretion ccm	Zeit	Pankreas-sekretion ccm	Gallen-sekretion ccm
1h55′	Inj. 2 ccm Sekretin		3h05′	0,14	1,13
2 00	0,48	0,44	3 20	0,11	0,95
2 05	0,12	0,23	3 35	0,08	0,96
2 10	0,03	0,21	3 50	0,09	0,96
2 15	0,02	0,24	4 05	0,09	0,90
2 20	0,02	0,22	4 20	0,09	0,70
2 20	Inj. 2 ccm MgF. = 332 g M;		4 35	0,10	0,54
	48 mg N		4 50	0,07	0,48
2 35	0,09	0,84	5 05	0,06	0,44
2 50	0,10	1,22	5 20	0,06	0,34

Über die Zerstörung einiger Aminosäuren durch Belichtung.

Von

Fritz Lieben.

(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Physiologischen Universitätsinstitut in Wien.)

(Eingegangen am 21. März 1927.)

Vor kurzem hat *Harris*[1]) in einer interessanten Veröffentlichung gezeigt, daß bei Bestrahlung von Proteinen mit der Quecksilberlampe von sämtlichen Aminosäuren nur Tyrosin und Tryptophan Sauerstoff aufnehmen. Es wurden reine Proteine sowie eine große Anzahl von Aminosäuren bestrahlt und die Erhöhung des Effekts durch Hämatoporphyrin und Chlorophyll, deren photodynamische Wirksamkeit zuerst *Hausmann*[2]) beschrieben hat, festgestellt. Da solche Lichtoxydationen nur mit einer *Zerstörung* der beiden genannten Stoffe einhergehen können, erschien es von Interesse, den Umfang dieser Zerstörung je nach Art, Intensität und Dauer der Belichtung, sowie den Effekt von Sensibilisatoren und sonstigen Zusätzen an Hand der im hiesigen Institut ausgearbeiteten Methoden der quantitativen Tyrosin- und Tryptophanbestimmungen[3]) kennenzulernen. Auch Histidin, Dioxyphenylalanin und Adrenalin wurden in den Kreis der Untersuchung gezogen.

In seinen grundlegenden Arbeiten über photochemische Veränderungen von biochemisch wichtigen Stoffen hatte *Neuberg*[4]) als Effekt der Belichtung von α-Aminosäuren (im Sonnenlicht und diffusen Tageslicht bei Anwesenheit von mineralischen Katalysatoren) die

---

[1]) *D. Th. Harris*, Biochem. Journ. **20**, 288, 1926; dort weitere Literatur; auf die starke Absorption von ultravioletten Strahlen durch Tyrosin und Tryptophan haben schon *Schmidt* und *Norman* (Journ. Infants Disease **27**, 40, 1920) aufmerksam gemacht.

[2]) *W. Hausmann*, diese Zeitschr. **12**, 331, 1908; **30**, 276, 1910; dort weitere Literatur.

[3]) *O. Fürth* und *A. Fischer*, ebendaselbst **154**, 1, 1924; *O. Fürth* und *Z. Dische*, ebendaselbst **146**, 275, 1924.

[4]) *C. Neuberg* und Mitarbeiter; ebendaselbst **13**, 305, 1908; **17**, 270, 1909; **27**, 271, 1910; **29**, 279, 1910; **39**, 158, 1912; **44**, 495, 1912; **61**, 315, 1914; **67**, 59 und 63, 1914 usw.; vgl. ferner *H. v. Euler* und Mitarbeiter, H. **71**, 311; diese Zeitschr. **39**, 410, 1912; **51**, 97, 1913.

Abspaltung von NH_3 und die Bildung des um 1 C ärmeren Aldehyds konstatiert; mehrfach wird die Analogie der oxydativen Lichtwirkung mit der des Wasserstoffsuperoxyds hervorgehoben; beim Tyrosin und Tryptophan wird speziell auf die Pigmentbildung aufmerksam gemacht. Auch erwähnt *Neuberg*, daß die Finsen- und Quarzlampe analoge Umwandlungen bewirken.

In derselben Richtung wie die Untersuchungen von *Neuberg* und *Harris* bewegt sich die während der Ausführungen der folgenden Versuche erschienene Arbeit von *Gaffron*[1]), in der speziell der Einfluß von *Sensibilisatoren* auf die O_2-Absorption der Proteine, des Tyrosins, Phenols usw. beobachtet wurde. In Übereinstimmung mit den folgenden Versuchen wird die starke Beschleunigung der Lichtoxydation des Tyrosins durch *Alkali* hervorgehoben.

I. Bestrahlung von Tyrosin und Tryptophan mit der Quarzlampe.

Die folgenden Versuche wurden mit einer Quarzquecksilberlampe von *Heräus* (Gleichstrom 220 Volt), deren Brenner noch nicht stark abgenutzt worden war, ausgeführt. Die Spannung derselben ist den Schwankungen des städtischen Stromnetzes unterworfen, so daß immer nur Proben *desselben Versuchs* untereinander unmittelbar vergleichbar sind.

Auch darf die Lichtoxydation des Tyrosins nicht direkt mit der des Tryptophans verglichen werden, da vom ersteren Stoff stets je 5 ccm, von letzterem 2 bis 4 ccm Lösung verwendet wurden. Die Millonreaktion wird nämlich am besten mit 5 ccm, die Voisenetreaktion mit 2 ccm angesetzt, und es erwies sich am sichersten, um Fehler (durch Verdunsten) zu vermeiden, stets die *ganze* bestrahlte Probe zur Anstellung der kolorimetrischen Reaktion zu verwenden, andrerseits aber spielt natürlich die Schichtdicke, wie aus den Versuchen zu entnehmen, für die Lichtwirkung eine bedeutende Rolle.

Wenn nicht ausdrücklich anders bemerkt, wurde Tyrosin (*Merck*) in 0,1 % Lösung in n/50 NaOH, reinstes Tryptophan (*Pfanstiehl*) in 0,1 % Lösung in 1 % NaF-Lösung verwendet. Die benutzte Hämatoporphyrinlösung enthielt 0,1 % Hämatoporphyrinchlorhydrat in einer 1 % NaCl-Lösung, von der je 100 ccm außerdem 3 ccm n/10 NaOH enthielten. Die Lösung von Rose Bengale enthielt 0,1 % Farbstoff (R. B.) in Wasser. Um den Effekt der Erhitzung durch die Bestrahlung möglichst herabzusetzen, wurden die Schälchen (s. Tabelle) in einer größeren flachen Schale mit Wasser gekühlt. Ein bei einer vertikalen Entfernung von 35 cm unter die Lampe gelegter Schwarzkugelvakuumthermometer zeigte 41 bis 42° C[2]).

[1]) *H. Gaffron*, diese Zeitschr. **179**, 157, 1926.

[2]) Die Flüssigkeit in den niederen, wassergekühlten Schälchen dürfte diese Temperatur nicht ganz erreicht haben.

Da es sehr wichtig war, den *Einfluß der Temperatur* auf die Tyrosin- bzw. Tryptophanzerstörung kennenzulernen, wurde eine Reihe von Versuchen auf dem siedenden Wasserbad (bei etwa 60°) und im *Brutschrank* bei *39 bis 43°* (also gerade der bei der Quarzlampe in Betracht kommenden Temperatur) angestellt. Bei den letzteren Versuchen im *offenen* Schälchen ergab sich:

	Dauer der Erwärmung Std.	Prozentgehalt nach Erwärmung
a) 5 ccm 0,1 % Tyrosin	1	0,094 0,095
b) 5 „ 0,1 % „	2	0,091 (bedecktes Schälchen: 0,100)
c) 5 „ 0,1 % „	3	0,084
d) 2 „ 0,1 % Tryptophan . . .	1	0,100
e) 2 „ 0,1 % „ . . .	2	0,099
f) 2 „ 0,1 % „ . . .	3	0,097

Auch im Wasserbad ist, bei natürlich gesteigertem Temperatureffekt, Tryptophan weniger empfindlich als Tyrosin.

Vergleicht man diese Zahlen mit den Daten der folgenden Tabelle I, so kann festgestellt werden, daß bei der in Betracht kommenden Versuchsanordnung beim Tryptophan ein von der Lichtwirkung unabhängiger Einfluß der Temperatur bzw. des Eindampfens [in f) war die Probe bis auf wenige Tropfen eingedunstet] sich in keinem Falle geltend machen kann; beim Tyrosin kann in einigen Versuchen ein sehr geringer Temperatureffekt auch unabhängig vom Lichteffekt bestehen, so daß es vorzuziehen ist, lieber etwas länger bei größerer Lampendistanz als kurz bei großer Lampennähe zu bestrahlen, doch kann dieser Effekt nichts an den im folgenden aus der Tabelle I gezogenen Schlüssen betreffs der Lichtwirkung ändern[1]).

Weitere Versuche mit der Quarzlampe werden zugleich mit den Versuchen im diffusen Licht besprochen werden.

Besprechung der Tabelle I.

Wir sehen zunächst, daß erst bei einer Entfernung von etwa 40 cm zwischen der Lampe und den zu bestrahlenden Proben eine Zerstörung der beiden Aminosäuren wahrzunehmen ist, was sich äußerlich durch eine stärkere oder schwächere bräunliche Verfärbung kundgibt. Dabei

[1]) Selbstverständlich übt die Wärme auch auf Lichtreaktion eine beschleunigende Wirkung aus. Versuche, in denen eisgekühlte Proben im Quarzlicht mit solchen ohne Kühlung verglichen wurden, ergaben minimale (kaum außerhalb der Versuchsfehler liegende) Differenzen bzw. höhere Werte bei den gekühlten Proben.



Tabelle I.

Nr.	Aminosäure	Zahl der ccm	Distanz der Quarzlampe	Dauer der Bestrahlung	Sensibilisator ccm	Prozentgehalt der Lsg. *nach* der Bestrahlung	Zusatz	Anmerkungen
1 a	Tyrosin	—	71 cm horizontal	2 Std.	θ	0,10		Lösungen in Quarzröhren, die in ein Quarzbecherglas mit Wasser tauchen
b	Tryptophan	—	20 „ vertikal	2 „	θ	0,10		
2 a	Tyrosin	—	40 „ „	30 Min.	θ	0,083		Schalen mit flachem Boden, mit Quarzplatte bedeckt, Wasserkühlung
b	Tryptophan	—	40 „ „	30 „	θ	0,096		
3 a	Tyrosin	5	40 „ „	35 „	0,1 Hp.	0,074		Schalen wie in 2, doch *offen*
b	„	5	40 „ „	35 „	θ	0,085		
c	Tryptophan	4	40 „ „	35 „	θ	0,084		
4 a	Tyrosin	5	40 „ „	40 „	0,1 Hp.	0,073		Von nun an werden lauter gleich große zylindrische Schalen von 5 cm Durchm. verwendet; wenn nicht anders bemerkt, *offen* (ohne Deckplatte) und mit Wasserkühlung
b	„	5	40 „ „	40 „	θ	0,087		
c	Tryptophan	3	40 „ „	40 „	0,1 Hp.	0,075		
d	„	3	40 „ „	40 „	θ	0,089		
5 a	Tyrosin	5	20 „	40 „	0,2 Hp.	0,073		In b ist Hp. während des Versuchs ausgefallen
b	„	5	20 „	40 „	0,3 „	0,091		
c	„	5	20 „	40 „	θ	0,073		
d	„	10	20 „	40 „	θ	0,088		
6 a	Tyrosin	5	θ	40 Std.	0,1 Hp.	0,103		Kontrollversuch im Dunkeln (Kasten)
b	Tryptophan	3	θ	40 „	0,1 „	0,108		
7 a	Tyrosin	5	17 „ (etwas schräg. Strahleneinfall)	30 Min.	0,1 „	0,065		a in Schälchen, mit Quarzplatte bedeckt
b	„	5	17 „	30 „	0,1 „	0,107		b in Quarzeprouvette
8 a	„	5	35 „	43 „	0,1 R. B.	0,063	θ	e und f Kontrolle im Kasten
b	„	5	35 „	43 „	θ	0,041	1. Tr. 30 % H_2O_2 (*Merck*)	
c	„	5	35 „	43 „	0,1 R. B.	unkol.		
d	„	5	35 „	43 „	θ	0,076	θ	
e	„	5	θ	θ	0,1 R. B.	0,088	1 Tr. H_2O_2	
f	„	5	θ	θ	θ	0,090	1 „ „	

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Aminosäure	Zahl der ccm	Distanz der Quarzlampe	Dauer der Bestrahlung	Sensibilisator ccm	Prozentgehalt der Lsg. *nach* der Bestrahlung	Zusatz	Anmerkungen
9a	Tryptophan	2	35 cm	1 Std.	0,1 R. B.	0,044	θ	e und f im Kasten
b	„	2	35 „	1 „	θ	0	1 Tr. H_2O_2	
c	„	2	35 „	1 „	0,1 R. B.	0	1 „ „	
d	„	2	35 „	1 „	θ	0,070	θ	
e	„	2	θ	θ	0,1 R. B.	0	1 Tr. H_2O_2	
f	„	2	θ	θ	θ	0	1 „ „	
10a	„	2	35 „	1 „	—	0,096	θ	e und f im Kasten
b	„	2	35 „	1 „	0,1 R. B.	0,067	θ	
c	„	2	35 „	1 „	—	0,054	2 Tr. 2% HCOH in Alkohol	
d	„	2	35 „	1 „	0,1 R. B.	+ unkol.	Dasselbe	
e	„	2	θ	θ	0,1 R. B.	0,069	„	
f	„	2	θ	θ	—	0,068	„	
11a	Tyrosin	5	35 „	1 „	0,1 R. B.	0,058	θ	Die Millonansätze der *belichteten* Proben mit R. B. mußten vor dem Kolorimetrieren filtriert werden. d, e und f sind im Dunkeln als Kontrolle
b	„	5	35 „	1 „	0,1 R. B.	0,052	0,025 g NaCl	
c	„	5	35 „	1 „	0,1 R. B.	0,053	0,050 g „	
d	„	5	θ	θ	0,1 R. B.	0,095	θ	
e	„	5	θ	θ	0,1 R. B.	0,098	0,025 g NaCl	
f	„	5	θ	θ	0,1 R. B.	0,088	0,050 g „	
12a	„	5	35 „	1 „	0,1 R. B.	0,054	θ	Wie in 11, 2 Tropfen $NaNO_2$ werden zu c und d erst nach 1/2 Stunde zugefügt, dann wird d und b ins Dunkle gebracht; e samt $NaNO_2$ als Kontrolle im Dunkeln
b	„	5	35 „	1/2 „	0,1 R. B.	0,065	θ	
c	„	5	35 „	1 „	0,1 R. B.	0,039	2 Tr. 30% $NaNO_2$	
d	„	5	35 „	1/2 „	0,1 R. B.	0,057	Dasselbe	
e	„	5	θ	θ	0,1 R. B.	0,094	„	

erwies sich die Versuchsanordnung mit offenen, zylindrischen Schälchen, die senkrecht unter der Lampe stehen, am geeignetsten [Versuch 7 zeigt den Unterschied im Effekt bei Verwendung von Schälchen (mit Quarzplatte) und Quarzeprouvette; der Wert in a) dürfte durch Wärmewirkung (s. oben) etwas herabgedrückt sein]. Bedeutend wird der Effekt erhöht bei Zusatz eines Sensibilisators, wobei Hp. oder R. B. ungefähr gleich wirksam sind; auch die Verfärbung wird bei Sensibilisatorzusatz ausgeprägter. Es sei erwähnt, daß gleichzeitig mit Tyrosin usw. bestrahlte Proben von *Alanin* und *Phenylalanin* (in n/50 Na OH) keinerlei Verfärbung zeigen, auch wenn Hp. zugesetzt wird. Die Verfärbung kann nun bei der Kolorimetrie Schwierigkeiten verursachen; besonders die Tyrosinprobe nach *Millon* ist davon oft braunstichig, so daß leicht zu hohe Werte abgelesen werden; häufig scheidet sich wieder (namentlich bei bestrahlten Proben mit R. B.-Zusatz) ein bräunlicher Niederschlag ab, der vor dem Kolorimetrieren abfiltriert werden muß; man findet in diesem Falle Minimalwerte. Es können so Fehler von 10 bis 20 % entstehen, was wohl den *absoluten* Wert der im vorhergehenden und folgenden angegebenen Zahlen beeinträchtigt, nicht aber, oder nur in sehr viel geringerem Maße, den wichtigeren *Vergleichswert* der bestrahlten Proben desselben Versuchs untereinander. Man darf nur bei demselben Versuch, wenn eine Trübung auftritt, natürlich nie die Millonansätze eines Teiles der bestrahlten Proben nach Filtration, den anderen Teil aber ohne Filtration kolorimetrieren. Auch bei dem Voisenetansatz für Tryptophan können Verfärbungen stören bzw. kann die Stabilität der Farbe durch die schon infolge der Bestrahlung eingeleitete Melanoidinbildung leiden; man darf also mit dem Kolorimetrieren nicht zu lange warten.

Minimal ist der Fehler, der durch den *Sensibilisator* in der Färbung des Ansatzes entsteht; man kann auch zum Vergleichsstandard die gleiche Menge Sensibilisator zusetzen, doch wird, wenigstens beim Tryptophan, das Kolorimetrieren dadurch nicht erleichtert. Nicht angeführte Orientierungsversuche ergaben, wie zu erwarten, daß größere *Schichtdicke* den Effekt der Lichtzerstörung durch die Quarzlampe hemmt (s. auch Nr. 5d) und daß eine Erhöhung der *Tyrosinkonzentration* die Lichtwirkung bedeutend beeinträchtigt. Andererseits sieht man aus Nr. 11, daß Zusatz von *Kochsalz* die Wirkung des *Lichtes* nicht beeinflußt, während der Dunkelversuch f) eine kleine Herabsetzung der Millonfarbe durch NaCl erkennen läßt. Der Kontrollversuch Nr. 6 ergibt die wichtige, immer wieder bestätigte Tatsache, daß Proben mit Sensibilisator im *Dunkeln* nur innerhalb der Fehlergrenzen vom Standard abweichende Werte ergeben. Versuch Nr. 5 zeigt, daß ein größerer Zusatz an Sensibilisator den Effekt der Bestrahlung *nicht* erhöht (was auch durch einen Versuch mit R. B. bestätigt wurde).

Von Interesse ist die Wirkung des *Wasserstoffsuperoxyds* (in etwa zehnfach äquivalentem Überschuß zum Tyrosin). Während es schon im Dunkeln Tyrosin (langsamer) und Tryptophan (schneller) zerstört, *addiert* sich im Licht seine Wirkung zu der der Bestrahlung bzw. des Sensibilisators. Ferner aber zeigt sich hier und in weiteren Versuchen, daß beim Tyrosin (Versuch Nr. 8) es in den Proben mit H_2O_2 *nicht* zur Melaninbildung kommt, während beim Tryptophan (Versuch Nr. 9), welches durch H_2O_2 rasch zerstört wird, dieser Hemmungseffekt kaum wahrzunehmen ist (oft erscheint die Melaninbildung eher verstärkt); dies kann an Verschiedenheiten in den chemischen Eigenschaften der beiden Pigmente liegen (s. analoge Versuche im diffusen Licht). Versuch Nr. 10 zeigt (in Übereinstimmung mit den Versuchen im diffusen Licht, Näheres s. dort) die starke Wirkung von *Formaldehyd* auf die Tryptophanzerstörung, die sich zur Lichtwirkung addiert, ohne selbst vom Lichte abzuhängen.

Natriumnitrit (in etwa zehnfachem Überschuß verwendet, Nr. 12) zerstört im Dunkeln nur wenig (s. Nr. 12c), unterstützt aber die Lichtoxydation des Tyrosins; die Verfärbung ist bei den belichteten Proben mit $NaNO_2$ stärker als in denen ohne Zusatz.

Weitere Versuche mit Tyrosin und Tryptophan unter Verwendung von *Chlorophylläthylid* (3 Tropfen 0,1% Lösung in CH_3OH) als Sensibilisator wurden nicht in die Tabelle aufgenommen, da der Sensibilisator zumeist schon während der Bestrahlung ausfiel und außerdem auch im Dunkelversuch die Farbreaktion häufig abgeschwächt befunden wurde, obwohl Zusatz von Chlorophylläthylid die Millon- bzw. Voisenetreaktion an und für sich nicht stört. Auch ist Chlorophylläthylid im Quarzlicht nicht beständig[1]).

II. Tyrosin und Tryptophan im diffusen Tageslicht.

Orientierungsversuche, mit dem Zwecke, die Wirksamkeit der Strahlen verschiedener Wellenlänge im Lichte der Quecksilberdampflampe zu sondern, führten dazu, als für die Lichtoxydation maßgebend, keineswegs ausschließlich oder auch nur vorwiegend den ultravioletten Anteil des Lichtes anzusehen. Es mußte also auch im *diffusen Tageslicht* Lichtoxydation vor sich gehen, wie ja schon *Neuberg* (l. c.) mit Zusatz von mineralischen Sensibilisatoren usw. gezeigt hatte.

Besprechung der Tabelle II.

Die angeführten Versuche wurden in den Monaten November, Dezember 1926 und Januar 1927 unter Ausnützung heller Tagesstunden bei möglichst günstigem Wetter angestellt. Die Proben standen in den schon erwähnten zylindrischen Gefäßen von 5 cm Durchmesser, mit

---

[1]) Vgl. *Gaffron*, l. c.; B. **60**, 755, 1927.



Tabelle 11.

Nr.	Aminosäure	Zahl der ccm	Dauer der Exposition im Lichte	Sensibilisator ccm	Prozentgehalt der Lsg. nach der Exposition	Zusatz	Anmerkungen
1a	Tyrosin	5	etwa 40 Std.	θ	s. Anm.		Orientierungsvers.; heller Tag: Proben a und c nicht angegriffen, in b Tyrosin fast völlig zerstört, in d Tryptophan auf etwa 50% abgesunken
b	„	5	„ 40 „	0,1 Hp.			
c	Tryptophan	3	„ 40 „	θ			
d	„	3	„ 40 „	0,1 Hp.			
2a	Tyrosin	5	„ 12 „	θ	$0{,}10_4$		Heller Tag
b	„	5	„ 12 „	0,1 Hp.	0,023		
c	Tryptophan	3	„ 12 „	θ	0,097		
d	„	3	„ 12 „	0,1 Hp.	0,043		
3a	Tyrosin	5	θ	0,1 Hp.	$0{,}10_3$		Kontrollversuch im Kasten durch 40 Std.
b	Tryptophan	3	θ	0,1 Hp.	$0{,}10_8$		
4a	Tyrosin	5	2 Std. 20 Min.	0,1 Hp.	0,074		
b	Tryptophan	3	2 „ 20 „	0,1 Hp.	0,078		
5a	Tyrosin	5	etwa 20 Std.	0,1 R. B.	+ unkol.		Proben c und f als Kontrolle im Kasten. Werte d und e sind wegen Verdunsten der Probe (von der 2 ccm zur Kolorimetrie verwendet wurden) zu hoch
b	„	5	„ 20 „	θ	$0{,}10_5$		
c	„	5	θ	0,1 R. B.	0,098		
d	Tryptophan	3	etwa 20 Std.	0,1 R. B.	(etwa 0,05)		
e	„	3	„ 20 „	θ	(„ 0,11)		
f	„	3	θ	0,1 R. B.	$0{,}10_7$		
6a	Tyrosin	5	etwa 12 Std.	0,1 R. B.	+ unkol.	θ	e und f als Kontrolle im Dunkeln. Bedeckter Himmel, ziemlich hell
b	„	5	„ 12 „	0,1 R. B.	+ „	1 Tr. 30% H_2O_2	
c	„	5	„ 12 „	θ	0,087	1 „ 30% „	
d	„	5	„ 12 „	θ	0,091	θ	
e	„	5	θ	0,1 R. B.	0,083	1 Tr. 30% H_2O_2	
f	„	5	θ	θ	0,072	1 „ 30% „	
7a	„	5	etwa 18 Std.	0,1 Hp.	0,056	θ	Ziemlich hell. c wurde nach 3 Stunden ins Dunkle gebracht
b	„	5	„ 18 „	0,1 Hp.	0,035	nach 3 Std. Expos.: 1 Tr. 30% H_2O_2	
c	„	5	„ 3 „	0,1 Hp.	0,082	θ	

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr.	Aminosäure	Zahl der ccm	Dauer der Exposition im Lichte	Sensibilisator ccm	Prozentgehalt der Lsg. nach der Exposition	Zusatz	Anmerkungen
8a	Tryptophan	2	etwa 25 Std.	0,1 Hp.	0,058	θ	Wechselndes Wetter. c wurde nach 15 Stunden ins Dunkle gebracht
b	„	2	„ 25 „	0,1 Hp.	0	nach 15 Std. Expos.: 1 Tr. H_2O_2	
c	„	2	„ 15 „	0,1 Hp.	0,062	θ	
9a	„	2	„ 16 „	θ	0,060	2 Tr. 2% HCOH in Alkohol	Ziemlich hell. Proben d, e und f im Kasten als Kontrolle
b	„	2	„ 16 „	0,1 Hp.	0,034		
c	„	2	„ 16 „	0,1 Hp.	0,052	θ	
d	„	2	θ	θ	0,064	2 Tr. 2% HCOH	
e	„	2	θ	0,1 Hp.	0,051	2 „ 2% „	
f	„	2	θ	0,1 Hp.	0,090	θ	
10a	Tyrosin	5	etwa 4 Std.	θ	0,098	2 Tr. HCOH	Mäßig hell. Proben d, e und f zur Kontrolle im Kasten
b	„	5	„ 4 „	0,1 Hp.	0,091	2 „ „	
c	„	5	„ 4 „	0,1 Hp.	0,083	θ	
d	„	5	θ	θ	0,089	2 Tr. HCOH	
e	„	5	θ	0,1 Hp.	0,096	2 „ „	
f	„	5	θ	0,1 Hp.	0,094	θ	
11a	„	5	„ 3½ „	0,1 R. B.	0,066	θ	Ziemlich hell
b	„	5	„ 3½ „	0,1 R. B.	0,071	0,025 g NaCl	
c	„	5	„ 3½ „	0,1 R. B.	0,067	0,05 g „	
12a	„	5	„ 16 „	0,1 Chl.*)	0,087		Heller Tag. *) 0,1% Chlorophylläthylid in Methylalkohol. Proben b und e als Kontrolle im Dunkeln
b	„	5	θ	0,1 Chl.	0,102 0,101		
c	„	5	etwa 16 Std.	0,1 R. B.	0		
d	ryptophan	2	„ 16 „	0,1 Chl.	0,098		
e	„	2	θ	0,1 Chl.	0,083 0,094		
f	„	2	etwa 16 Std.	0,1 R. B.	+ unkol.		

Uhrgläsern bedeckt, unter einem Schutzdach aus Glas im Freien, doch niemals im direkten Sonnenlicht. Als „Dauer der Exposition" wurde nur die Zeit gerechnet, in der die Probe tatsächlich im Freien im diffusen Licht stand.

Es zeigte sich zunächst, daß Tyrosin- und Tryptophanlösungen ohne Sensibilisator gar nicht angegriffen werden, daß jedoch bei Zusatz von Hp. oder R. B. schon nach kurzer Zeit eine Verfärbung eintritt, der eine mehr oder minder starke Abnahme des Tyrosin- bzw. Tryptophangehalts entspricht. Die Geschwindigkeit dieser Abnahme hängt natürlich von der Dauer der Exposition und der Intensität des diffusen Lichtes ab, ferner, wie beim Adrenalin noch ausführlicher erörtert werden soll, von der *Alkaleszenz* der Lösung, während die Schichtdicke hier eine viel geringere Rolle spielt als bei der Quarzlampenbestrahlung.

Auf dieser Förderung der Lichtzerstörung im alkalischen Medium beruht wohl die Beobachtung, daß bei Proben ohne weiteren Zusatz (außer dem Sensibilisator) Tyrosin (in n/30 NaOH) gewöhnlich stärker abnimmt als Tryptophan (in 1% NaF), obwohl letzteres in dünnerer Schicht verwendet wurde.

Die Kontrollproben mit Sensibilisator im Dunkeln zeigen sämtlich nur geringfügige Abweichungen vom ursprünglichen Prozentgehalt.

H_2O_2 zeigt auch hier seine durch Oxydation zerstörende Wirkung, die vom Lichte unabhängig ist, die Wirkung des Lichtes aber unterstützt. Beim Tyrosin bleibt die Pigmentbildung fast völlig aus, beim Tryptophan, wo die Zerstörung schon im Dunkeln eine völlige ist, kann dieser Effekt nicht festgestellt werden (s. unten). In den Versuchen Nr. 7 und 8 wurden drei Proben durch eine bestimmte Zeit zugleich exponiert und eine bestimmte, für das Auge ziemlich gleichmäßige Verfärbung erzielt; dann wurde die erste Probe ins Dunkle gebracht (c) und gleichzeitig zu der zweiten Probe (b) 1 Tropfen H_2O_2 zugesetzt und diese, mit der dritten unverändert gelassen (a), noch eine weitere Zeit dem Licht ausgesetzt. Die Verfärbung zeigte am Ende des Versuchs beim Tyrosin die Abstufung: $3 > 1 > 2$. Da in dem Moment des H_2O_2-Zusatzes alle Proben ziemlich gleichmäßig verfärbt waren, ergibt sich, daß die Verfärbung von 2 gegenüber der unverändert gebliebenen (1) abgenommen hatte, d. h. daß das H_2O_2 nicht nur die *Entstehung* der Pigmente im Licht verhindert, sondern auch schon entstandene wieder beseitigen kann.

Es erschien wünschenswert, für das Auftreten und Verschwinden der Tyrosinmelanine[1]) zahlenmäßige Anhaltspunkte zu gewinnen; zu

[1]) Vgl. *O. v. Fürth* und *E. Jerusalem*, Hofmeisters Beitr. **10**, **131**, **1907**, wo die Wirkung von Alkaleszenz, H_2O_2-Zusatz, metallischen Katalysatoren usw. auf die Melaninbildung durch *tierische und pflanzliche Tyrosinasen* mit dem Spektrophotometer untersucht wurde.

diesem Zwecke wurden die belichteten Tyrosinproben im *Spektrophotometer* von *Hüfner* verglichen, nachdem die Störung durch den Sensibilisator, der sich durch die gewöhnlichen Lösungsmittel nicht ausschütteln läßt, durch einige Tropfen n/10 H_2SO_4 (bis zur schwach sauren Reaktion gegen Lackmus) beseitigt worden war.

a) Es wurden drei Proben zu 5 ccm 0,1% Tyrosin mit je 3 Tropfen Rose Bengale bei gutem Lichte exponiert. Probe 1 stand 12 Stunden in gutem Lichte. Probe 2 wurde nach 4½ Stunden ins Dunkle gestellt, zur Probe 3 nach 4½ Stunden 1 Tropfen 30% H_2O_2 (*Merck*) zugesetzt. Die Spektrophotometrie im grünen Spektralbezirk gab:

für Probe 1:	56,2°	Extinktionskoeffizient . . .	0,509
„ „ 2:	51,8°	„ . . .	0,417
„ „ 3:	28,3°	„ . . .	0,111

Von den nach 4½ Stunden optisch vollkommen gleich gefärbten Proben hatte sich Probe 1 noch ein wenig tiefer verfärbt, Probe 3 dagegen stark aufgehellt.

b)

Nr.	Aminosäure	Zahl der ccm	Sensibilisator	Expositionsdauer Std.	Zusatz	Prozentgehalt nach der Exposition	Spektrophotometr. Winkel	Extinktionskoeffizient	Anmerkungen
1	0,1% Tyrosin	10	R. B.	etwa 16	—	0,034	53,2°	0,445	Gutes Licht. Proben 3 und 4 wurden nach 8 Stunden ins Dunkle gebracht
2		10		„ 16	nach 8 Std. 1 Tr. 30% H_2O_2	+ unkol.	34,5	0,168	
3		10		„ 8		0,037	35,3	0,176	
4		10		„ 8	—	0,043	49,7	0,378	

Man sieht, in Übereinstimmung mit a), daß die Melaninbildung bei guter Beleuchtung relativ bald erfolgt, im späteren Verlauf der Exposition nur wenig zunimmt, dagegen durch H_2O_2 im Licht sowie im Dunkel stark zurückgeht; im Licht vielleicht etwas rascher.

Beim Tryptophan ist die Probe b) in Nr. 8 stärker verfärbt als a), die Abstufung b > a > c, doch war dieser Effekt nicht immer deutlich wahrzunehmen und ließ sich auch im Spektrophotometer nicht feststellen, da der Farbstoff (R. B.) wegen der Pufferwirkung des NaF nicht leicht zu beseitigen war.

Ein analoger Versuch wie Nr. 7 mit der Quarzlampe bestätigte die eben erwähnten Befunde.

Nach dem oxydierend wirkenden H_2O_2 kam ferner als reduzierender Stoff *Formaldehyd* zur Anwendung. Beim Tyrosin war, wie Versuch Nr. 10 und ein (nicht angeführter) Quarzlampenversuch zeigt, keinerlei deutliche Wirkung weder im Dunkeln noch im Licht zu erzielen, dagegen reagiert Tryptophan (Nr. 9) im Licht und Dunkel mit HCOH, so daß der Lichteffekt deutlich erhöht erscheint. Ob diese Wirkung auf einer

Reduktion oder, was wahrscheinlicher ist, auf einer Einleitung der Melanoidinbildung in der Art der Reaktion von *Voisenet*[1]) beruht, kann zur Zeit nicht sicher entschieden werden. Auch Versuch Nr. 9 wurde durch einen analogen Quarzlampenversuch bestätigt (s. Tabelle I, Nr. 10).

Versuch Nr. 11 zeigt, analog zu Nr. 12 in Tabelle I, daß Zusatz von NaCl bis zu 1% die Lichtwirkung auf Tyrosin nicht beeinflußt. Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 2% stört bereits die Versuchsergebnisse durch Niederschlagsbildung mit dem *Millon*schen Reagens.

Aus Nr. 12 erkennt man schließlich den großen Unterschied zwischen der Wirkung von R. B. und *Chlorophylläthylid* in diffusem Lichte; sowohl beim Tyrosin wie beim Tryptophan ist zwischen den Licht- und Dunkelproben mit Chlorophylläthylid kein erheblicher Unterschied, während in den beiden Proben mit R. B. die Aminosäuren fast vollständig verschwunden sind. Die Abnahme, die häufig auch in den Dunkelproben mit Chlorophylläthylid auftritt, dürfte an einer Beeinflussung der Farbreaktionen liegen. Auch im diffusen Licht wird der Sensibilisator allmählich zerstört (s. oben).

III. Belichtung von Dioxyphenylalanin und Adrenalin.

a) Bestimmungsmethode.

Vor dem Eingehen auf die Belichtungsversuche sei kurz über eine neue Ausführungsart der kolorimetrischen Bestimmung dieser Stoffe berichtet[2]).

Es wurden Lösungen von 0,1% Dioxyphenylalanin (*Merck*) in n/100 HCl und Suprarenin-Chlorhydrat synthet. 1 : 1000 in steriler 0,9% NaCl (Höchster Farbwerke) verwendet. Die Reaktion erfolgt in alkalischer Lösung, und zwar wird außer $FeCl_3$ nur eine 10% *Natriumcarbonat- oder -acetatlösung ohne weiteren Zusatz* benutzt. Die Farbe ist bei beiden Stoffen mit Na_2CO_3 schön rot, mit einem leichten Stich ins Violette, mit Acetat prächtig blauviolett (ganz ähnlich der Voisenetreaktion auf Tryptophan). Die Farben sind klar und durch mindestens 2 Stunden unverändert haltbar.

Die Reaktion wird am besten in folgender Weise ausgeführt: zu den etwa 1 bis 4 ccm der Dioxyphenylalanin bzw. Adrenalinlösung wird 10% Natriumcarbonat oder -acetat in graduierter Eprouvette zugefügt und auf 15 ccm aufgefüllt; man setzt dann 1% $FeCl_3$ (wenn wenig Adrenalin usw. zu erwarten, ist eine noch verdünntere Lösung zu empfehlen) tropfenweise aus der Pipette zu. Nach jedem Tropfen mischt man durch Umgießen in eine andere Eprouvette und setzt dies fort, bis der zuletzt zugefügte Tropfen

[1]) Vgl. *O. v. Fürth* und *F. Lieben*, diese Zeitschr. **116**, 224, 1921.

[2]) Siehe *O. v. Fürth*, H. **29**, 115, 1900.

beim Einfallen in die Flüssigkeit keine dunkleren Farbschlieren mehr erzeugt, dann füllt man mit der Carbonat- bzw. Acetatlösung auf 20 ccm auf und kann nach wenigen Minuten kolorimetrieren.

Es wurden z. B. 1, 2, 3 und 4 ccm obiger *Adrenalinlösung* mit Wasser auf je 4 ccm aufgefüllt. Die Kolorimetrie mit Natriumacetat ergab bei Einstellung der jeweils stärkeren Lösung auf zehn folgende Zahlen als Mittelwerte von je sechs Ablesungen:

1 : 2	19,2	statt	20,0	— 4%	Fehler
	20,4			+ 2%	„
2 : 3	16,2	„	15,0	+ 8%	„
	15,0			0%	„
2 : 4	21,3	„	20,0	+ 6,5%	„
1 : 3	30,0	„	30,0	0%	„

Man kann auch Adrenalinlösungen 1 : 10000 bei Verwendung von sehr verdünntem $FeCl_3$ und Auffüllen auf nur 10 ccm (statt 20) gut kolorimetrieren. Der analoge Vorgang beim Dioxyphenylalanin ergab:

1 : 2	20,9	statt	20,0	+ 4,5%	Fehler
2 : 3	14,3	„	15,0	— 4,7%	„
3 : 4	13,8	„	13,3	+ 3,8%	„
1 : 3	29,6	„	30,0	— 1,3%	„

b) Belichtungsversuche.

Die ersten Versuche mit den oben erwähnten Lösungen von Adrenalin und Dioxyphenylalanin[1]) ergaben nun sowohl bei Bestrahlung mit der Quarzlampe (40 cm Distanz, 1 Stunde Dauer) als bei der Exposition im hellen, diffusen Tageslicht überraschenderweise keinerlei Effekt. Es trat mit und ohne R. B.-Zusatz keine Abschwächung der Farbreaktion ein. Dies führte nun auf die Vermutung, daß die *saure Reaktion* der obigen Lösungen die Lichtzerstörung verhindere oder wenigstens sehr stark verzögere, und es wurden zum Vergleich je 5 ccm einer Tyrosinlösung in n/50 HCl und in n/50 NaOH, beide mit R. B., durch etwa 9 Stunden dem Tageslicht ausgesetzt; dabei blieb die Millonreaktion der sauren Lösung unverändert (dasselbe ist auch der Fall bei Zusatz von H_2O_2), während die der alkalischen auf etwa den halben Wert absank. Die Lösungen müssen also alkalisch sein, um im Licht innerhalb der Versuchszeiten verändert zu werden[2]).

An dieser Bedingung aber scheiterten die Versuche mit dem *Dioxyphenylalanin.* Sowie nämlich die Reaktion die Lackmusneutralität nach der alkalischen Seite überschreitet, färbt sich die Dioxyphenylalaninlösung *sofort* unter Melaninbildung, und die eventuell später nach obiger Vorschrift angestellte Reaktion gibt sogleich eine Abscheidung schwärzlicher Flocken.

---

[1]) *Harris* (l. c.) hat das Sauerstoffabsorptionsvermögen dieses Stoffes im Quarzlicht festgestellt.

[2]) Vgl. *Gaffron,* l. c.

Es blieb also nur die Möglichkeit, bei *lackmusneutraler* Reaktion zu belichten; aber hierbei konnte weder mit der Quarzlampe noch im diffusen Tageslicht ein Effekt erzielt werden. Die angesetzte Farbreaktion erwies sich als wenig haltbar (im Gegensatz zu nicht neutralisierten Proben) und die gleich einsetzende, allmähliche kolloidale Melaninbildung täuscht meist eine stärkere Reaktion als die des Standards vor (auch bei den neutralisierten Kontrollproben im Dunkeln). Bei H_2O_2-Zusatz sind die angesetzten Farbproben, gleichgültig, ob im Lichte oder Dunkeln, nicht einmal minutenlang haltbar, sondern es setzt sofort Flockenbildung ein.

Beim *Adrenalin* ließen sich die Versuche in schwach alkalischem Medium durchführen. Es erwies sich als am besten, zu 3 ccm Adrenalinlösung 7 Tropfen n/10 NaOH zuzusetzen, wobei die Reaktion gegen Lackmus schon deutlich alkalisch wird; diese Lösung verändert sich im Dunkeln nicht. Bei Belichtung erhält man ziemlich haltbare, abgeschwächte Farben, und zwar sind die mit Natriumacetat angestellten Proben gegen den Vergleichsstandard meist etwas rötlich verfärbt, was die Kolorimetrie erschwert, so daß es sich empfiehlt, bei der Kolorimetrie von belichteten Proben die Reaktion mit Na_2CO_3 anzustellen[1]).

Ein Orientierungsversuch im diffusen Licht für 3 ccm schwach alkalischen 0,1% Adrenalins ergab eine Abnahme auf 0,066%, während eine Kontrollprobe im Kasten auf 0,103% verblieb; eine analog mit n/10 NaOH schwach lackmusalkalisch gemachte Probe von 5 ccm Tyrosin (in n/50 HCl) gab nur die minimale Abnahme auf 0,093%. Versuche zur Ermittlung des Wärmeeinflusses im Brutschrank bei etwa 40° für je 3 ccm 0,1% Adrenalin (mit 7 Tropfen n/10 NaOH schwach alkalisch gemacht) im *offenen* Schälchen bei einer Versuchsdauer von 1 Stunde 0,100, 2 Stunden 0,096, 2 Stunden 40 Minuten 0,086% Adrenalin; es gelten hier also die oben beim Tyrosin gemachten Feststellungen.

Wir sehen, speziell bei den Versuchen mit der Quarzlampe, daß bei gleicher, schwach alkalischer Reaktion Adrenalin etwas stärker angegriffen wird als Tyrosin, wie ja von einem Brenzcatechinderivat gegenüber einem Phenolderivat zu erwarten; bei Lackmusneutralität (Nr. 3) ist die Wirkung ceteris paribus natürlich geringer. H_2O_2-Zusatz läßt die Acetat- oder Carbonatreaktion im Licht und Dunkel gleich nach Gelb verblassen; die Melanine werden, wie beim Tyrosin, durch H_2O_2 entfernt.

Die in Nr. 8 angegebenen Verfärbungsabstufungen zeigen, daß von den nach 7 Stunden optisch gleich gefärbten Proben die weiter belichtete Probe a) sich gegen die nach dieser Zeit ins Dunkle gebrachte Probe d) weiter verfärbt hat, während b) und c) sich aufhellen, und zwar

[1]) Zwei gleich lange belichtete Proben von Adrenalin ergaben übrigens die gleichen Abnahmen, wenn die eine mit Acetat, die andere mit Carbonat kolorimetriert wurde, doch war die Kolorimetrie im zweiten Falle leichter auszuführen.

Tabelle III für Adrenalin.

Nr.		Zahl der ccm	Distanz cm	Dauer der Belichtung	Sensibilisator ccm	Zusatz	Prozentgehalt der Lsg. nach der Bestrahlung	Anmerkungen
					a) Quarzlampe			
1a	Adrenalin	3	35	1 Std. 20 Min.	0,1 R. B.		0,060	Probe c im Kasten; Proben d und e werden wie die anderen mit n/10 NaOH gerade schwach alkalisch gemacht; man sieht die sehr geringe Abnahme
b	"	3	35	1 " 20 "	θ		0,065	
c	"	3	θ	θ	0,1 R. B.		0,089	
d	Tyrosin HCl	5	35	1 Std. 20 Min.	0,1 R. B.		0,081	
e	"	5	35	1 " 20 "	θ		0,088	
2a	Adrenalin	3	35	1 Std.	Hp.		0,075	Probe c im Kasten: d und e wie in Nr. 1
b	"	3	35	1 "	θ		0,081	
c	"	3	θ	θ	Hp.		0,101	
d	Tyrosin HCl	5	35	1 Std.	Hp.		0,095	
e	"	5	35	1 "	θ		0,094	
3a	Adrenalin	3	35	1 "	Hp.	1 Tr. 30% H_2O_2	+ verblaßt	Reaktion ist hier lackmusneutral; Proben e und f im Kasten
b	"	3	35	1 "	θ	1 " 30% "	gleich in gelb	
c	"	3	35	1 "	Hp.	θ	0,070	
d	"	3	35	1 "	θ	θ	0,078	
e	"	3	35	1 "	Hp.	} 1 Tr. H_2O_2	+ verblaßt	
f	"	3	35	1 "	θ	}	gleich in gelb	
4a	"	3	35	1 "	0,1 R. B.	θ	0,074	Proben c und d werden nach 1/2 Std. Bestrahlung in den Kasten gestellt
b	"	3	35	1 "	0,1 R. B.	} nach 1/2 Std.	+ unkol.	
c	"	3	35	1/2 "	0,1 R. B.	} 1 Tr. 30% H_2O_2	+ "	
d	"	3	35	1/2 "	0,1 R. B.	θ	0,086	
5a	"	3	35	1 "	0,1 R. B.	θ	0,065	Proben c und d nach 1/2 Std. in den Kasten gebracht; e als Kontrolle im Kasten. Verfärbung b > c > a > d
b	"	3	35	1 "	0,1 R. B.	nach 1/2 Std. 2 Tr. 30% $NaNO_2$	+ unkol.	
c	"	3	35	1/2 "	0,1 R. B.	Dasselbe	+ "	
d	"	3	35	1/2 "	0,1 R. B.	θ	0,078	
e	"	3	θ	θ	0,1 R. B.	+ 2 Tr. $NaNO_2$	0,095	

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr.		Zahl der ccm	Distanz cm	Dauer der Belichtung	Sensibilisator ccm	Zusatz	Spektrophotometrie	Prozentgehalt der Lsg. nach der Bestrahlung	Anmerkungen
					b) Diffuses Tageslicht.				
6a	Adrenalin	3		etwa 13 Std.	0,1 R. B.			0,084	Bedeckter Himmel; Proben b und d im Kasten; alle Proben werden, wie oben, mit n/10 NaOH gerade schwach alkalisch gemacht
b	„	3		θ	0,1 R. B.			0,102	
c	Tyrosin in n/50 HCl	5		etwa 13 Std.	0,1 R. B.			0,087	
d	„ „ n/50 „	5		θ	0,1 R. B.			0,100	
7a	Adrenalin	3		etwa 5 Std.	0,1 R. B.			0,086	Bedeckter Himmel; Proben b u. d im Kasten usw. wie in 6
b	„	3		θ	0,1 R. B.			0,094	
c	Tyrosin in n/50 HCl	5		etwa 5 Std.	0,1 R. B.			0,091	
d	„ „ n/50 „	5		θ	0,1 R. B.			0,100	
8a	Adrenalin	3		etwa 15 Std.	0,1 R. B.	—		0,048	Gutes Licht; Proben c u. d nach 7 Stunden, e und f sofort im Dunkeln. Verfärbung: a > d > c > b
b	„	3		„ 15 „	0,1 R. B.	nach 7 Std. 1 Tr. 30% H_2O_2		unkol.	
c	„	3		„ 7 „	0,1 R. B.	Dasselbe		„	
d	„	3		„ 7 „	0,1 R. B.	θ		0,044	
e	„	3		θ	0,1 R. B.	1 Tr. H_2O_2 sofort		unkol.	
f	„	3		θ	0,1 R. B.	θ		0,102	
9a	„	3		etwa 15 Std.	0,1 R. B.	θ	75,8°	1,221	Proben c und d nach 9 Std. ins Dunkle gebracht
b	„	3		„ 15 „	0,1 R. B.	nach 9 Std. 1 Tr. 30% H_2O_2	43,7	0,282	
c	„	3		„ 9 „	0,1 R. B.	Dasselbe	44,1	0,288	
d	„	3		„ 9 „	0,1 R. B.	θ	66,9	0,813	

b) offenbar rascher als c); es werden also die *schon gebildeten Melanine* weggeschafft. Die Messung mit dem Spektrophotometer (Nr. 9) (nach Zusatz einiger Tropfen n/10 H_2SO_4 wegen der störenden Farbe des Sensibilisators) zeigt im grünen Spektralbezirk, wie beim Tyrosin (s. oben) geringe Zunahme der Melaninbildung im späteren Verlauf der Exposition, starken Rückgang derselben durch H_2O_2 sowohl im Licht als im Dunkel.

$NaNO_2$ (Nr. 5) vernichtet nur bei Belichtung (nicht im Dunkeln) die Farbreaktion, verstärkt die Melaninbildung. Es ergibt sich also wie beim Tyrosin (s. Tabelle I, Nr. 12) ein interessanter Unterschied gegenüber der Wirkung des H_2O_2, da der Effekt des $NaNO_2$ von der Lichtwirkung abhängig zu sein scheint.

IV. Belichtung von Histidin.

Obwohl *Harris* (l. c.) eine Sauerstoffaufnahme beim Histidin als Chlorhydrat nicht hatte feststellen können, legte der zyklische Bau und ungesättigte Charakter dieser Aminosäure doch die Möglichkeit einer Zerstörung im Licht nahe. Die Versuche zeigten, daß eine solche Zerstörung tatsächlich stattfindet, daß aber auch hier die *Alkaleszenz der Lösung* von entscheidendem Einfluß ist.

Als Präparat wurde l-Histidin-Monochlorhydrat (Hoffmann-La Roche A.-G.) verwendet, zur Bestimmung diente die kolorimetrische Methode von *Koessler* und *Hanke*[1]).

Ein Orientierungsversuch, bei dem eine 0,119% Lösung des obigen Histidinsalzes in Wasser, zusammen mit 0,1% Tyrosinlösung (in n/50 NaOH), beide mit Hp. als Sensibilisator, durch 4½ Stunden bei gutem, diffusem Tageslicht exponiert wurden, ergab *keine* Änderung bei der Histidinlösung gegenüber einer Abnahme der Tyrosinlösung auf 0,059%; bei einer Bestrahlung mit der Quarzlampe (40 cm Distanz, 30 Minuten Dauer) war der Effekt ähnlich, wenn auch weniger ausgeprägt; die Histidinlösung enthielt noch etwa 90%, die Tyrosinlösung 77% des ursprünglichen Gehalts. Der Effekt wird natürlich auch beim Histidin stärker, wenn man 1 Stunde bei 20 cm Distanz bestrahlt, der Histidinwert sinkt dann mit und ohne Hp.-Zusatz auf etwa 33% des Ausgangswertes, doch schon der Umstand der Einflußlosigkeit des Sensibilisators deutet darauf hin, daß es sich bei einer so intensiven Bestrahlung nicht mehr um einen reinen Lichteffekt handelt und jedenfalls auch die Erwärmung dabei eine größere Rolle spielt[2]). Nach den Erfahrungen beim Adrenalin usw. wurden nun auch hier alkalische Lösungen verwendet.

---

[1]) *K. K. Koessler* und *M. T. Hanke*, Journ. of biol. Chem. **39**, 497, 1919.

[2]) Bei einer solchen intensiven Bestrahlung (25 cm Lampendistanz) kann auch in einer neutralen Adrenalinlösung eine Zerstörung bewirkt werden.



Tabelle IV. Histidin.

Nr.		Zahl der ccm	Distanz cm	Dauer der Belichtung Std.	Sensibilisator ccm	Prozentgehalt der Lsg. nach der Belichtung (ursprünglicher Gehalt 100)	Anmerkungen
				a) Diffuses Licht.			
1a	0,1% Histidin HCl	5		10	R. B.	93	Zu c u. d werden 25 Tr. n/10 NaOH zugesetzt. b und d sind als Kontrolle im Dunkeln
b	Dasselbe	5		θ	R. B.	100	
c	"	5		10	R. B.	0	
d	"	5		θ	R. B.	95	
2a	"	5		7½	R. B.	77	Gutes Licht; zu a werden 25 Tr. Wasser, zu b, c und d je 25 Tr. n/10 NaOH zugesetzt, d ist als Kontrolle im Kasten. *) Gibt nach langem Stehen eine sehr schwache, unkolor. Reaktion
b	"	5		7½	R. B.	0	
c	"	5		7½	θ	100	
d	"	5		θ	R. B.	100	
3a	Histidin	5		2½	R. B.	88	Gutes Licht; zu a 25 Tr. Wasser, zu b, c und d je 25 Tr. n/10 NaOH, c und d im Kasten; d wurde vor d. Kolorimetrie neutralisiert, c nicht, was ohne Einfluß erscheint
b	"	5		2½	R. B.	+ unkol.	
c	"	5		θ	R. B.	100	
d	"	5		θ	R. B.	100	
4a	"	5		2½	R. B.	100	Mäßiges' Licht; zu b 25 Tr. n/10 NaOH
b	"	5		1	R. B.	47	
				b) Quarzlampe.			
5a	Histidin HCl	5	35	1	R. B.	39	Zu a 25 Tr. Wasser, zu b 25 Tr. n/10 NaOH
b	"	5	35	1	R. B.	+ unkol.	

In Bestätigung der Orientierungsversuche sehen wir also einen zweifellos bestehenden Effekt in *saurer* Lösung im diffusen Licht, der im Quarzlampenlicht sehr ausgiebig werden kann (Nr. 5a), dagegen im *alkalischen* Milieu eine komplette *Vernichtung der Farbreaktion binnen kürzester Zeit* (bei einstündiger Beleuchtung in mäßig hellem Tageslicht nimmt die Reaktion auf 47% des Ausgangsmaterials ab, Nr. 4b). Bei den Dunkelproben tritt keine Änderung des Histidingehalts ein. Eine schwache Verfärbung der *alkalischen* Histidinprobe ist nach Belichtung zu erkennen, sonst ist, wie zu erwarten, eine Bildung melaninartiger Produkte nicht wahrzunehmen. Erwärmen einer solchen alkalischen Histidinlösung im Brutschrank auf etwa 40° durch 1 und 2 Stunden bewirkt *keine Abnahme* des Gehalts.

V. Behandlung mit einem Radiumpräparat und mit Röntgenstrahlen.

A.

Die starke Zerstörung, die die in dieser Arbeit beobachteten Stoffe im Lichte der Quecksilberdampflampe und im diffusen Tageslicht erleiden, legte es nahe, an eine ähnliche Beeinflussung bei Behandlung

mit anderen Strahlenarten zu denken. So konnte man einen zerstörenden Effekt der *β- und γ-Strahlen des Radiums* vermuten. Ein solcher Effekt wurde auch tatsächlich für das Tyrosin konstatiert; nur ist die Einwirkung eine so außerordentlich langsame[1]), daß eine weitere Ausdehnung der Versuche für den vorliegenden Zweck wenig lohnend erschien, zumal ja jeweils für einen Versuch nur ein einziges Radiumpräparat zur Verfügung stand. Dasselbe enthielt 76 mg Radium als $RaCl_2$ in einem zugeschmolzenen Röhrchen von ½ mm Glasdicke. Für die freundliche Bereitstellung des Präparats und sonstige Unterstützung bei der Ausführung der Versuche bin ich Herrn Professor Dr. *Karl Przibram* vom *Radiuminstitut in Wien* zu großem Danke verpflichtet.

5 ccm 0,1 % Tyrosin in n/50 NaOH wurden in einen Meßzylinder gebracht, das Röhrchen mit dem Radiumpräparat in die Lösung hineingestellt und das Ganze im Dunkeln (in der Kasse des Radiuminstituts) verwahrt.

a) Dauer der Exposition: 114 Stunden. Die Flüssigkeit ist nach dem Versuch schwach gelblich verfärbt. *Millon* (Mittel von zwei Ansätzen): 0,092 %.

b) Expositionsdauer: 244 Stunden. Schwach gelbliche Verfärbung, *Millon*: 0,085 %.

c) Zusatz von 3 Tropfen Rose Bengale-Lösung; Expositionsdauer: 260 Stunden; *Millon*: 0,094 %.

Die erwähnte *Verfärbung* der bestrahlten Proben zeigt an, daß die sehr geringfügige Abnahme des Tyrosingehalts doch als eine wirkliche (außerhalb der Versuchsfehler bestehende) anzusehen ist.

B.

Durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Prof. Dr. *G. Holzknecht*, wofür ich ihm und Herrn Assistenten Dr. *Presser* meinen ergebensten Dank ausspreche, wurde es mir möglich gemacht, im *Zentral-Röntgeninstitut des Wiener Allgemeinen Krankenhauses* zwei Bestrahlungen vorzunehmen.

Es wurden ohne Filter bei einer Objekt-Fokus-distanz von 23 cm und einer Effektivspannung von 120 Kilovolt (Stromstärke 3 Milliampere), das eine Mal 50, das zweitemal 100 Holzknechteinheiten[2]) verfolgt. Das erstemal war kein Effekt wahrzunehmen; das zweitemal sah man beim Tyrosin (5 ccm 0,1 % Lösung in n/50 NaOH) eine gelbliche

---

[1]) Eine träge Einwirkung war übrigens nach dem umfangreichen Versuchsmaterial von *A. Kailan* zu erwarten (Monatshefte für Chemie).

[2]) In dem Institut werden *3 Holzknechteinheiten* als die Dosis weicher unfiltrierter Röntgenstrahlen bezeichnet, die auf der Gesichtshaut gerade eine leichte Rötung hervorrufen. Die Messung erfolgt mit der Farbtablette von *Holzknecht-Sabouraud*.

Verfärbung; während die Tryptophanlösung (4 ccm in 1 % NaF) farblos geblieben war; dabei enthielt das Tyrosinpräparat noch 90 %, das Tryptophanpräparat 89 % des ursprünglichen Gehalts von Aminosäure. Also auch hier besteht zweifellos eine Einwirkung, die aber im Vergleich zu der vom Licht der Quarzlampe verursachten außerordentlich langsam vonstatten geht.

VI. Zusammenfassung.

1. Es wird die oxydative Zerstörung von Tyrosin und Tryptophan bei Belichtung, die die Sauerstoffaufnahme dieser Aminosäuren im Lichte der Quarzlampe nach den Versuchen von *Neuberg* und *Harris* erwarten ließ, mit Hilfe kolorimetrischer Meßmethoden verfolgt. Diese Zerstörung wird bei *Quarzlampenbestrahlung* durch Sensibilisatoren (Hämatoporphyrin oder Rose Bengale) *erhöht*, im *diffusen Tageslicht* ist der Effekt durch die Anwesenheit von Sensibilisatoren *bedingt*. Außer der Lampendistanz und Bestrahlungsdauer bzw. Intensität des Tageslichts und Expositionsdauer spielt die Schichtdicke und Konzentration der Aminosäurelösung, ferner die *Alkaleszenz* derselben eine Rolle. Es wurden zumeist 0,1 % Lösungen verwendet. Ist die Lösung neutral oder sauer, so ist der Effekt innerhalb der angegebenen Versuchsdauer *nicht* wahrzunehmen. *Wasserstoffsuperoxyd*, das bekanntlich Tyrosin und Tryptophan zerstört, addiert sich in seiner oxydierenden Wirkung zu der des Lichts, ohne selbst darin vom Licht abzuhängen. Beim Tyrosin werden durch H_2O_2 die Melanine beseitigt bzw. deren Entstehung gehindert, was auch mit Hilfe des Spektrophotometers gezeigt wurde; beim Tryptophan kann ein solcher Effekt nicht festgestellt werden; die Pigmente der beiden Stoffe dürften verschiedener Natur sein. *Natriumnitrit* verstärkt ebenfalls die Lichtoxydation, aber auch die Melaninbildung, scheint jedoch im Dunkeln kaum zu wirken. Ein Effekt von *Formaldehydzusatz* ist nur beim Tryptophan wahrzunehmen, es reagiert (wie H_2O_2) im Licht und Dunkel (offenbar unter Einleitung der Melanoidinbildung) gleichmäßig und erhöht die Lichtwirkung.

2. Es wird eine neue Ausführungsart zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung von Adrenalin bzw. Dioxyphenylalanin beschrieben.

3. Während beim Dioxyphenylalanin die für die Lichtwirkung obligate schwache Alkaleszenz sofort Melaninabscheidung hervorruft, konnte beim Adrenalin in schwach lackmusalkalischer Lösung ein Lichteffekt festgestellt werden, der den in einer ungefähr ebenso schwach alkalischen Tyrosinlösung übertrifft. H_2O_2 und $NaNO_2$ wirken analog wie beim Tyrosin, auch in bezug auf Beseitigung bzw. Verstärkung der Melaninbildung.

4. Beim Histidin-HCl ist der Lichteffekt, beobachtet nach der Methode von *Koessler* und *Hanke*, schon in schwach saurem Medium wahrzunehmen, in alkalischer Lösung aber außerordentlich stark.

5. Beim Eintauchen eines Radiumpräparats (76 mg Ra) durch etwa 10 Tage in eine 0,1 % Tyrosinlösung (in n/50 NaOH) zeigt eine schwache Verfärbung und geringe Gehaltsabnahme der Tyrosinlösung eine allerdings äußerst langsame Einwirkung an; dieselbe geringe Abnahme bei sehr langsamer Einwirkung ist bei der Behandlung von Tyrosin und Tryptophan mit *Röntgenstrahlen* wahrzunehmen.

Die Versuche sollen auf Pepton- und Eiweißlösungen ausgedehnt werden.

Zur Methodik der Milchsäurebestimmung im Harn.

Von

Josef Warkany.

(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Wiener Physiologischen Universitätsinstitut und aus der Wiener Universitäts-Kinderklinik.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der „Seegenstiftung" der Akademie der Wissenschaften in Wien.)

(Eingegangen am 21. März 1927.)

Obwohl eine Reihe von Milchsäurebestimmungsmethoden für den Harn angegeben worden sind, die recht gute Resultate zutage fördern, fand dennoch keine der angegebenen Methoden eine genügend weite Verbreitung. Das liegt wohl in erster Linie daran, daß alle beschriebenen Methoden noch recht kompliziert sind, so daß sich z. B. Serienbestimmungen sehr zeitraubend gestalteten und nur in seltenen Fällen durchgeführt werden konnten. Dabei liegt die Schwierigkeit nicht an der Milchsäurebestimmung an sich, sondern vor allem an der Abtrennung der Milchsäure aus dem Harn bzw. an der Befreiung des Harns von störenden Substanzen.

Die am meisten geübte Methode ist gegenwärtig die von *Clausen*[1]). Der Harn wird zunächst mit Natriumwolframatlösung und Schwefelsäure gefällt, das Filtrat nach Zufügen von Phosphatpufferlösung durch kurzdauernde Ätherextraktion von den Phenolen befreit. Nach Zugabe von Ammonsulfat wird nun der Harn eine halbe Stunde mit Äther extrahiert, dann alkalisch gemacht und nun der Äther abdestilliert und der Ätherrückstand bis fast zur Trockne eingedampft. Im Rückstand wird nun nach der schon von *Meissner*[2]) und *Schneyer*[3]) geübten Methode, die eigentliche Bestimmung durch Überführen der Milchsäure in Kohlenoxydgas und Messung desselben, durchgeführt. Von *Polonowski*[4]) wurde eine kolorimetrische Milchsäurebestimmungsmethode angegeben, die auf einer Braunfärbung von Milchsäurelösungen auf Zusatz von alkoholischer Codeinlösung beruht. Im Jahre 1913 wurde unter Leitung von Prof. *O. Fürth* von

---

[1]) *S. W. Clausen*, Journ. of biol. Chem. **52**, 263, 1922.
[2]) *R. Meissner*, diese Zeitschr. **68**, 175, 1915.
[3]) *J. Schneyer*, ebendaselbst **70**, 294, 1915.
[4]) *Polonowsky*, C. r. d. sc. de la soc. de biol. **83**, 13, 475, 1920.

Ishihara[1]) eine Milchsäurebestimmungsmethode ausgearbeitet, die auf dem *Fürth-Charnass*schen Verfahren beruht, das an sich recht einfach und leicht durchführbar ist. Doch war die Vorbereitung des Harns, insbesondere die Abtrennung der Milchsäure aus demselben zu kompliziert, so daß die Methode, die recht gute Werte lieferte, keine ausgedehnte Verbreitung fand. Der Harn wird zunächst mit Phosphorwolframlösung gefällt, filtriert und die überschüssige Phosphorwolframsäure mit Barytwasser entfernt. Ein Überschuß an Baryt wurde nun nach Filtration durch Einleiten von Kohlensäure beseitigt, dann wurde von dem entstehenden Niederschlag abfiltriert und dieses Filtrat im rotierenden *Lindt*schen Apparat der Extraktion unterworfen. Bis zur Extraktion waren demnach drei Fällungen und drei Filtrationen erforderlich. Nun folgt erst die 24stündige Extraktion, nach welcher der Äther nach Zufügen von Ammoniak verdampft wird. Daran schließt sich nun die eigentliche Milchsäurebestimmung nach *Fürth-Charnass*.

Im folgenden seien nun Versuche mitgeteilt, die bezweckten, die Methode von *Ishihara*, die, wie schon erwähnt, gute Resultate lieferte, so weit zu vereinfachen, daß auch eine größere Anzahl von Bestimmungen, gleichzeitig durchgeführt, nicht allzuviel Zeit in Anspruch nehmen.

Besonders zeitraubend bei diesem Verfahren war wohl die Ätherextraktion im *Lindt*schen Apparat.

In letzter Zeit war nun von *Meyerhof*, *Hirsch-Kauffmann* u. a. ein Verfahren geübt worden, das in Organen Milchsäurebestimmungen ohne Extraktion gestattet. Es werden nämlich nach der Enteiweißung die Kohlenhydrate durch eine *Kupfer-Kalk*fällung entfernt, so daß im Filtrat sofort die eigentliche Milchsäurebestimmung angeschlossen werden kann.

Es war nun nicht möglich, im voraus zu sagen, ob dieses Verfahren ohne weiteres auf den Harn übertragen werden könne, da im Harn möglicherweise Substanzen enthalten sein könnten, die nach Enteiweißung und Kupfer-Kalkfällung in Lösung blieben und gleich der Milchsäure Aldehyd liefern könnten. Es wurde daher zunächst versucht, festzustellen, ob nach dieser Methode im Harn Milchsäurewerte gefunden werden, die mit den nach anderen Methoden gefundenen übereinstimmen.

I. Versuchsreihe.

a) 100 ccm Harn wurden mit 20 ccm 10% H_2SO_4 und 80 ccm 20% Phosphorwolframsäure (PWS) versetzt und somit auf 200 ccm verdünnt. Nach mehrstündigem Stehen wurde filtriert und zur Entfernung der PWS das Filtrat mit Ätzbaryt versetzt und abermals filtriert. Durch dieses Filtrat wurde nun Kohlensäure durchgeleitet und von dem gebildeten Niederschlag wieder abfiltriert. 160 ccm dieses Filtrats wurden nun mit feingepulvertem Calciumhydroxyd (*Kahlbaum*) versetzt und mit 10% Kupfersulfatlösung auf 200 ccm aufgefüllt. Diese

[1]) *Ishihara*, diese Zeitschr. 50, 468, 1913.

Fällung wurde mindestens eine halbe Stunde stehengelassen, dann abfiltriert und in 175 ccm des Filtrats die Milchsäurebestimmung nach *Fürth-Charnass* ausgeführt. Da im Harn neben der Milchsäure noch andere Permanganat reduzierende Substanzen zu erwarten waren, wurde zur Oxydation eine etwa n/10 Kaliumpermanganatlösung verwendet. Vorgelegt wurde eine etwa n/100 Bisulfitlösung, die gegen eine genau n/100 Jodlösung gestellt worden war. Durch den entstehenden Aldehyd wurde eine 6,7 ccm n/100 Jodlösung entsprechende Bisulfitmenge gebunden. Es waren daher in den 175 ccm Filtrat, die zur Bestimmung verwendet worden waren, 6,7 × 0,5 mg[1]) Milchsäure, das sind 3,3 mg. Da mit aliquoten Teilen gearbeitet worden war, errechnet sich für 100 ccm Harn nach den oben angegebenen Zahlen ein Wert von 4,8 mg, somit eine Menge, die eher kleiner ist als die gewöhnlich in normalen Harnen gefundene. Es war somit erwiesen, daß nach den genannten Fällungen in den Filtraten außer der Milchsäure keine störenden, aldehydliefernden Substanzen in Lösung blieben.

b) Zusatzversuche.

Es wurde nun versucht, die Verwendbarkeit der Methode an Zusatzversuchen zu erproben. Dabei wurde so vorgegangen, daß zunächst der Prozentgehalt eines Harns an Milchsäure ermittelt worden ist und gleichzeitig zu 100 ccm desselben Harns eine bekannte Menge Lithiumlactat zugesetzt wurde. Der in diesem Harn gefundene Wert ist in der folgenden Tabelle mit dem Sollwerte (Leerwert des Harns + Milchsäurezusatz) verglichen. In dieser Tabelle sind auch zwei Versuche angeführt, bei welchen dem Harn außer der Milchsäure noch je 1 g Glucose zugesetzt worden war, um festzustellen, ob letztere bei dem angegebenen Verfahren keine Störung verursache.

Sollwert	Gefundener Wert	Glucosezusatz g	Gefunden % des Sollwertes
10,1	10,2	0	100,9
60,6	58,8	0	97,0
78,9	76,4	0	96,8
115,0	124,5	0	108,2
169,0	154,2	1	91,3
174,5	184,4	1	105,6
180,5	196,1	0	108,6

Die immerhin nicht unerheblichen Abweichungen der gefundenen Werte von den Sollwerten dürften durch die zahlreichen Fällungen und Filtrationen ausreichend erklärt sein.

[1]) Unter Anwendung der von *Fürth-Charnass* bei Verwendung von n/10 Permanganatlösung angegebenen Korrektur (0,5 statt 0,45).

In diesen Versuchen war wegen der größeren Mengen von Milchsäure n/10 Bisulfit- und Jodlösung verwendet worden.

Aus dieser ersten Versuchsreihe geht somit hervor, daß bei der Methode von *Ishihara* die Extraktion im *Lindt*schen Apparat durch eine Kupfer-Kalkfällung ersetzt werden kann.

II. Versuchsreihe.

In den oben angeführten Versuchen gingen der eigentlichen Milchsäurebestimmung vier Fällungen und vier Filtrationen voraus, von denen zwei zur Entfernung der Phosphorwolframsäure dienten. Um festzustellen, ob die Phosphorwolframsäurefällung überhaupt unerläßlich sei, wurde nun ein Harn direkt der Kupfer-Kalkfällung unterworfen und nun im Filtrat die Milchsäurebestimmung versucht. Dabei zeigte sich aber, daß so viele reduzierende Substanzen im Harn geblieben waren, daß die Oxydation auch nach mehr als 1 Stunde noch nicht als beendet betrachtet werden konnte. Auch wurden dabei abnorm hohe Aldehydmengen gebildet, so daß die Unterlassung der Phosphorwolframsäurefällung demnach nicht statthaft erscheint. Dagegen ließ sich eine weitgehende Vereinfachung dadurch erzielen, daß die Entfernung der überschüssigen PWS und die Kupfer-Kalkfällung in eine Fällung zusammengezogen wurden, so daß der Milchsäurebestimmung nur mehr zwei Fällungen vorausgehen; es erübrigt sich natürlich auch jede Extraktion.

a) Es wurden zu 50 ccm Harn 90 ccm PWS und 10 ccm 25% Schwefelsäure zugesetzt (Vol. 150 ccm). Diese Fällung wurde durch mehrere Stunden stehengelassen, dann wurde vom Niederschlag abfiltriert. Dabei wird eine rotviolette, aber klare Flüssigkeit erhalten. Zu 150 ccm dieses Filtrats wurden nun 10 g reinen pulverisierten Calciumhydroxyds zugesetzt und so lange verrührt, bis die rotviolette Farbe des Filtrats in blau umschlägt. Dieser Farbenumschlag ist das Zeichen dafür, daß die überschüssige PWS ausgefällt und damit die Reaktion alkalisch geworden ist. Bei Zusatz der oben angegebenen Calciumhydroxydmenge bleibt nach Ausfällung der PWS noch ein großer Überschuß, der nun zur Kupfer-Kalkfällung benutzt wird. Diese wurde einfach in der Weise durchgeführt, daß die nunmehr blau gefärbte PWS-Fällung mit 10% Kupfersulfatlösung auf 150 ccm aufgefüllt wurde. Nach gutem Umrühren wurde der nun entstehende blaugrüne Niederschlag 1 Stunde stehengelassen; darauf wurde abgenutscht, das Filtrat neutralisiert und so viel H_2SO_4 zugefügt, daß der Gehalt an dieser 0,5% betrug. Nun wurde die Milchsäure nach *Fürth-Charnass* bestimmt; es wurden für 100 ccm Harn 17,4 mg Milchsäure gefunden.



b) Zusatzversuche.

Diese Versuche wurden in derselben Weise durchgeführt wie die der ersten Versuchsreihe, nur wurden statt der dort durchgeführten vier Fällungen nur zwei in der oben beschriebenen Weise der Milchsäurebestimmung vorausgeschickt. Die Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle:

Milchsäuregehalt des Harns ohne Zusatz mg-%	Sollwert nach Milchsäurezusatz mg-%	Gefundener Wert mg-%	Glucosezusatz g	Gefunden % des Sollwertes
21,5*)	59,8	59,5	θ	99,4
21,5	98,1	99,7	θ	101,6
21,5	98,1	104,5	1	106,5
11,6	32,7	34,0	θ	103,9
11,6	59,7	60,1	θ	100,6
17,4**)	38,8	37,2	0,5	95,9
5,2†)	64,9	61,2	θ	94,2

*) Icterus cat. — **) Diabetes mellitus (Aceton θ, Sacchar. Spuren). — †) Nephritis.

Man ersieht aus obiger Tabelle, daß die Ergebnisse durch die beschriebene Vereinfachung keineswegs verschlechtert, sondern im Gegenteil verbessert worden sind, so daß sie durchaus empfehlenswert erscheint.

Empfohlene Methode zur Milchsäurebestimmung im Harn.

Zu 50 ccm Harn werden 90 ccm PWS und 10 ccm Schwefelsäure (25%) zugesetzt (150 ccm). Die Fällung wird durch einige Stunden stehengelassen. Dann wird filtriert. 120 ccm des Filtrats werden mit 10 g Calciumhydroxyd versetzt und mit 10% Kupfersulfatlösung auf 150 ccm aufgefüllt. Nach 1 Stunde wird abgenutscht, 100 ccm des Filtrats werden neutralisiert und so viel Schwefelsäure zugefügt, daß der Gehalt der Lösung an ihr 0,5% beträgt. Mit dieser Lösung wird nun die Milchsäurebestimmung nach *Fürth-Charnass* durchgeführt. Bei dieser wird zur Oxydation etwa n/10 Kaliumpermanganatlösung verwendet, die vorgelegte Bisulfitlösung und die zur Titration verwendete Jodlösung sind n/100 stark zu wählen, wenn es sich um normalen Harn handelt. Bei großem Milchsäuregehalt sowie bei Zusatzversuchen sind besser n/10 Lösungen zu verwenden. Die Berechnung ist bei Verbrauch von *a* ccm n/100 Jodlösung und bei Verwendung der oben angeführten aliquoten Teile folgende: $\frac{a \cdot 0{,}5 \cdot 150 \cdot 150 \cdot 2}{100 \cdot 120}$ = Prozentgehalt des Harns an Milchsäure in Milligrammen. Diese Methode ist auch bei zuckerhaltigem Harn verwendbar, nicht aber bei Anwesenheit von Oxybuttersäure und Aceton. Im letzteren Falle müßte die Milchsäure-

bestimmung nach der hier angegebenen Vorbereitung des Harns im Filtrat indirekt nach *Mondschein*[1]) bestimmt werden.

Zum Schluß seien noch die Analysenergebnisse einiger normaler und pathologischer Harne mitgeteilt, die mit Hilfe der oben angegebenen Methode erhalten wurden.

Normaler Mischharn	8,3	mg-%
„ „	14,6	„
„ „	4,6	„
„ „	6,7	„
„ „	10,3	„
Diabetes mellitus (Aceton θ)	17,4	„
Akute hämorrhagische Nephritis	5,2	„
Tuberkulöse Lebercirrhose	13,5	„
Icterus catarrhalis	21,5	„
Atrophische Lebercirrhose	25,6	„
Akute hämorrhagische Nephritis	24,8	„
Chronische Schrumpfniere	8,3	„
Carcinom mit Lebermetastasen	4,2	„
Klonische Krämpfe nach Trauma	36,2	„
Schwere Tetanie	15,3	„
Epilepsie (nach dem Anfall)	19,3	„

[1]) *Mondschein*, diese Zeitschr. 42, 91, 1912.

Zur Frage der Milchsäurezerstörung durch Erythrocyten.

Von

Josef Warkany.

(Aus der Abteilung für physiologische Chemie im Wiener Physiologischen Universitätsinstitut.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der „Seegenstiftung“ der Akademie der Wissenschaften in Wien.)

(Eingegangen am 21. März 1927.)

Es ist seit den Untersuchungen von *Slosse*[1]) bekannt, daß bei der Glykolyse durch Erythrocyten aus dem verschwundenen Zucker hauptsächlich Milchsäure gebildet wird. Ob die Erythrocyten die Fähigkeit besitzen, *die gebildete Milchsäure weiterzuverarbeiten*, ist deshalb von besonderem Interesse, weil es fraglich ist, ob kernlose Zellen oxydative Prozesse wie die Milchsäureverbrennung bewirken können. *Negelein*[2]) erwähnt, daß die Glykolyse anstieg, wenn die Atmung von *Kaninchenblut* durch Zugabe von Blausäure gehemmt worden ist. War dagegen die Atmung erhalten, so soll im Kaninchenblut ein Molekül veratmeten Sauerstoffs ein bis zwei Moleküle Milchsäure zum Verschwinden gebracht haben. Kernhaltige Blutzellen der Vögel weisen nach *Warburg*[3]) starke Atmung auf, und es scheint, daß hier die aerobe Milchsäurebildung Null ist, während anaerob Zucker gespalten wird. Die Atmung der kernhaltigen Blutzellen reicht aus, um die Milchsäurebildung zum Verschwinden zu bringen.

Im folgenden wird über Versuche berichtet, die entscheiden sollten, ob in steril entnommenem *Pferdeblut*, das durch Defibrinieren von Leucocyten befreit worden war, eine Milchsäurezerstörung in großem Umfange nachweisbar ist und ob eine solche durch Sauerstoffüberdruck gesteigert werden kann. Wissen wir doch aus *Fletcher* und *Hopkins*

---

1) *Slosse*, Arch. internat. de Physiol. **11**, 153, 1911.
2) *Negelein*, diese Zeitschr. **158**, 131, 1925.
3) *O. Warburg*, Zeitschr. f. Physiol. **59**, 112, 1909.

Untersuchungen, daß man im Muskel durch Sauerstoffüberdruck Milchsäure in großem Umfange zum Verschwinden bringen kann.

Die Milchsäurebestimmungen wurden in dieser Arbeit nach der *Fürth-Charnass*schen Methode durchgeführt, die Blutzuckerbestimmungen nach *Bang*. Sämtliche Versuche wurden mit defibriniertem Pferdeblut ausgeführt, das im Schlachthause steril — unmittelbar aus den Halsgefäßen — entnommen worden war. Es wurden nur solche Versuche verwertet, bei denen sich das Blut nach Beendigung des Versuchs als steril erwiesen hatte.

I.

Versuche über Milchsäurezerstörung sind im Blute deshalb erschwert, weil sich der Milchsäuregehalt des Blutes durch die Glykolyse ständig verändert. Es wurde deshalb zunächst durch *Vergleich des verschwundenen Zuckers mit der neugebildeten Milchsäure* festgestellt, ob der zerfallene Zucker quantitativ als Milchsäure zum Vorschein komme, oder ob vielleicht schon unter gewöhnlichen Bedingungen im Brutschranke Milchsäure weiter zerstört werde. Zu diesem Zwecke wurde in einem Versuch steril entnommenes, defibriniertes Pferdeblut in zwei Teile geteilt. Eine Hälfte wurde für 8 Stunden in den Brutschrank gebracht, die andere Hälfte wurde sofort auf Milchsäure und Zucker untersucht. Der Zucker wurde nach der *Bang*schen Methode bestimmt und entsprach einem Werte von 89 mg-%, der Milchsäuregehalt betrug 23 mg-%. Nach der Glykolyse war der Zuckergehalt auf 44 mg-% gesunken, während die Milchsäure einem Werte von 78 mg-% entsprach. Die Milchsäurezunahme betrug demnach 55 mg-%, die Glucoseabnahme aber nur 45 mg-%. Man sieht demnach in dieser Versuchsanordnung nicht nur kein Milchsäuremanko, sondern es ist sicherlich mehr Milchsäure entstanden als Glucose verschwunden ist. Man kann sich diese Tatsache mit der Annahme erklären, daß die gebildete Milchsäure nicht nur aus der mit der *Bang*schen Methode bestimmbaren Glucose stammt, sondern daß vielleicht auch andere im Blute enthaltene Kohlehydrate als Milchsäurebildner auftreten. Man könnte hier sowohl an Glykogen als auch an einen gebundenen Eiweißzucker denken. Wie dem auch immer sei, geht aus dem Gesagten jedenfalls hervor, daß ein Vergleich von Glucoseabnahme und Milchsäurezunahme zur Feststellung eines *geringen* Milchsäureabbaues durch Erythrocyten, wie er von *Negelein* gefunden worden ist, nicht ausreichend ist. Denn es mußte ja mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß eine etwaige Milchsäurezerstörung durch eine Neubildung von Milchsäure auf Kosten von kohlehydratartigen Substanzen, die nicht durch die *Bang*sche Methode bestimmt werden, *überkompensiert* wird. Parallelversuche ergaben ein ähnliches Resultat, z. B.:

Vor der Glykolyse		Nach der Glykolyse	
Milchsäure mg-%	Glucose mg-%	Milchsäure mg-%	Glucose mg-%
46	80	90	48
46	79	96	45

II.

Im folgenden sei über Versuche berichtet, die bezweckten, die Milchsäurezerstörung durch *reichliche Sauerstoffversorgung* zu beeinflussen. Diese Versuche wurden in der Weise durchgeführt, daß mit sterilem, defibriniertem Blute von bekanntem Milchsäuregehalt Parallelproben im Brutschranke aufgestellt wurden. Während aber eine Probe mit der atmosphärischen Luft in Berührung war, wurde die Parallelprobe in einer *Berthelot*schen Bombe bei einem Druck von 3 Atmosphären mit Sauerstoff in Berührung gebracht. Auch bei diesen Versuchen wurden nur Proben verwertet, die sich nach Beendigung des Versuchs als steril erwiesen hatten. Defibriniertes Pferdeblut, das einen Milchsäuregehalt von 30 mg-% hatte, wurde in zwei sterilisierte Glasgefäße verteilt. Während das eine nur mit Watte verschlossen wurde, wurde das andere in eine *Berthelot*sche Bombe gebracht, die nun in der bei kalorimetrischen Verbrennungen üblichen Weise mit Sauerstoff (3 Atm.) gefüllt wurde. Beide Proben wurden nun in den Brutschrank gebracht. Nach 10 Stunden betrug der Milchsäuregehalt der Probe, die in der Sauerstoffatmosphäre gestanden hatte, 74 mg-%, während die zweite Probe einen Milchsäuregehalt von 79 mg-% aufwies. Die Differenz dieser Werte liegt innerhalb der bei dieser Methode erlaubten Fehlergrenzen, so daß eine Beeinflussung der Milchsäurezerstörung durch die Sauerstoffatmosphäre ausgeschlossen werden kann.

In einem weiteren Versuch ließ ich die Milchsäurebildung zuerst unter normalem Druck vor sich gehen. Dann wurde die Probe unter Sauerstoffdruck gesetzt. Es resultierte ein Wert, der mit dem eben angeführten praktisch identisch ist.

III.

Es wurde nun noch auf einem anderen Wege versucht, den Abbau der Milchsäure durch Erythrocyten zu fördern. *Meyerhof*[1]) hat gezeigt, daß animalisches *Coenzym* die Atmung von Hefe und Muskelzellen, die durch Auswaschen der Coenzyme unterbunden war, wiederherstellen könne. Das animalische Coenzym wurde aus Muskelsaft gewonnen. Wir haben nun versucht, ob Zusatz von tierischem Coenzym zu Erythrocyten in milchsäurehaltigem Plasma den Milchsäureabbau fördern

[1]) *Meyerhof*, H. **101**, 165; **102**, 1, 1918.

könne. Zu diesem Zwecke wurde zu defibriniertem Blute eine Lösung von milchsaurem Lithium zugefügt und von dieser Suspension, nachdem ihr Milchsäuregehalt bestimmt worden war, je 100 ccm in ein Gefäß gebracht. Zu einer Lösung wurde nun Muskelkochsaft zugesetzt, darauf beide Gefäße für 8 Stunden in den Brutschrank gebracht. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die in beiden Gefäßen enthaltene Milchsäure bestimmt. Während zu Beginn des Versuchs der Milchsäuregehalt des Blutes 204 mg-% betragen hatte, war er nach seiner Beendigung infolge der Glykolyse in dem Blute, dem Coenzym zugesetzt worden war, auf 247 mg-%, im Kontrollgefäß auf 252 mg-% angestiegen. Eine Differenz konnte demnach durch Zugabe des Coenzyms nicht erzielt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß unter normalen Verhältnissen die Milchsäureproduktion bei der Glykolyse ein wenig größer gefunden wird, als der Menge des nach *Bang* nachweisbaren, verschwundenen Zuckers entspricht. Dennoch kann die Möglichkeit einer weiteren oxydativen Zerstörung der Milchsäure nicht ausgeschlossen werden, da ja die Möglichkeit besteht, daß ein gewisser Milchsäureverlust durch Milchsäurebildung — auf Kosten von kohlehydratartigen Substanzen, die durch die *Bang*sche Methode nicht nachweisbar sind — verdeckt wird.

Eine Förderung des Milchsäureabbaues durch Erythrocyten konnte weder durch erhöhten *Sauerstoffdruck* noch durch Zusatz von *Coenzym* erzielt werden.

Über die Klassifizierung tierischer Gewebe nach ihrem Stoffwechsel.

Von

Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 20. April 1927.)

Klassifizieren wir die Gewebe nach ihrer aeroben Glykolyse in vitro, so kommt es vor, daß dasselbe Gewebe je nach den Versuchsbedingungen einen verschiedenen Platz erhält. Beispielsweise ist die aerobe Glykolyse junger Rattenembryonen in Ringerlösung groß, in Serum klein. Leberschnitte in Ringerlösung bilden häufig aerob kleine Mengen Milchsäure, während sie in Serum nicht nur keine Milchsäure ausscheiden, sondern Milchsäure aus dem Serum aufnehmen. Es gibt ferner Gewebe, die in vitro — in Serum und aerob — Milchsäure produzieren, während sie, wie die Analyse der zuführenden und abführenden Blutgefäße lehrt, in vivo keine Milchsäure produzieren. Ursache dieses verschiedenen Verhaltens ist die große Empfindlichkeit der *Pasteur*schen Reaktion[1]), die schneller als die Atmung oder die Gärung leidet und durch die in vitro herrschenden Bedingungen unterbrochen werden kann.

Im folgenden wird eine Klassifizierung der Gewebe vorgeschlagen, die unabhängiger von den (zufälligen) experimentellen Bedingungen ist. Sie schließt sich an die frühere, auf der aeroben Glykolyse beruhenden Klassifizierung an und wird mit dieser identisch für den Grenzfall, daß die *Pasteur*sche Reaktion maximal wirkt.

I. Der Gärungsüberschuß *U*.

Die Erfahrung hat gelehrt, daß die Wirkung der Atmung auf die Gärung in gärenden Zellen einen Grenzwert besitzt. 1 Molekül veratmeten Sauerstoffs kann bis zu 2 Molekülen Milchsäure am Erscheinen

---

[1]) Diese Zeitschr. **172**, 432, 1926.

verhindern. Nur ganz selten fanden wir in gärenden Zellen eine größere Wirksamkeit, und immer nur dann, wenn die Versuchsfehler groß waren.

Wie man nun in der Thermodynamik nicht mit der zufälligen Arbeit rechnet, die eine chemische Reaktion unter irgendwelchen Bedingungen liefert, sondern mit der maximalen Arbeit, die sie bestenfalls liefern kann, so wollen wir bei der Klassifizierung der Gewebe nicht mit der zufälligen Wirksamkeit der *Pasteur*schen Reaktion, sondern mit ihrer maximalen Wirksamkeit rechnen. Wir führen zu dem Zwecke den Gärungsüberschuß U ein und definieren ihn durch die Gleichung

$$U = Q_M^{N_2} - | 2 Q_{O_2} |$$

U ist also der Gärungsüberschuß, der bei maximaler Wirkung der *Pasteur*schen Reaktion übrigbleibt. U ist Null, wenn die anaerobe Gärung gerade gleich der doppelten Atmung ist. Im übrigen ist U negativ oder positiv, je nachdem die doppelte Atmung (nach absolutem Betrag) größer oder kleiner ist als die anaerobe Gärung. Nur im letzten Falle ist die Atmung „zu klein" im Vergleich zur Gärung. Wirkt unter irgendwelchen Versuchsbedingungen die *Pasteur*sche Reaktion maximal[1]), so ist der berechnete Gärungsüberschuß U mit dem gefundenen identisch, d. h.

$$U = Q_M^{O_2}$$

und die alte und neue Klassifizierung fallen zusammen.

II. Tabelle der Gewebe.

In Tabelle I habe ich die früheren Ergebnisse, soweit sie Gewebe betreffen, neu zusammengestellt und die Werte für Milz und Placenta, die *Murphy* und *Hawkins* zuerst gemessen haben, hinzugefügt. Von Tumoren sind drei von uns untersuchte transplantierte Stämme aufgenommen (*Flexner-Jobling*, *Jensen*, *Rous*), sowie zwei Fälle von menschlichen Krebsen, die in bezug auf Krebszellen fast hundertprozentig waren.

Wie man sieht, liegen die U-Werte für die normalen Organe, mit Ausnahme der Retina, zwischen -39 und 0, während die Carcinome und Sarkome große positive U-Werte neben einer anaeroben Gärung von rund 30 geben.

---

[1]) In Serum ist dies häufiger der Fall als in Ringerlösung. Deshalb — und auch aus anderen Gründen — sollte der Stoffwechsel immer nur in Serum gemessen werden.

Tabelle I.

Gewebe	Literaturstelle	Q_{O_2}	$Q_M^{N_2}$	U	$\frac{U}{Q_M^{N_2}}$
Niere (Ratte)	Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924	—21	+3	—39	—
Schilddrüse (Ratte)	Ebendaselbst	—13	+2	—24	—
Leber (Ratte)	Ebendaselbst	—12	+3	—21	—
Darmschleimhaut (Ratte)	Ebendaselbst	—12	+4	—20	—
Milz (Ratte)	Journ. Gener. Physiol. **8**, 115, 1925	—12	+8	—16	—
Hoden (Ratte)	Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924	—12	+8	—16	—
Pankreas (Kaninchen)	Ebendaselbst	—5	+3	—7	—
Pankreas (Hund)	Ebendaselbst	—3	+4	—2	—
Submaxillaris (Kaninchen)	Ebendaselbst	—4	+3	—5	—
Thymus (Ratte, 3 Wochen)	Ebendaselbst	—6	+8	—4	—
Hirnrinde (Ratte)	Ebendaselbst	—11	+19	—3	—
Embryo (Ratte, 3 mg)	Ebendaselbst **165**, 122, 1925	—12	+13	—11	—
„ (Ratte, 0,9 mg)	Ebendaselbst	—13	+23	—3	—
„ (Huhn, 1,7 mg)	Ebendaselbst **152**, 309, 1924	—10	+20	0	—
Hyperplastische Rachenmandeln (Mensch)	Ebendaselbst	—9	+18	0	—
Placenta (Ratte)	Journ. Gener. Physiol. **8**, 115, 1925.	—7,3	+14,9	+0,3	—
Blasenpapillome (Mensch)	Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924	—13	+26	0	—
Nasenpolypen (Mensch)	Ebendaselbst	—5	+14	+4	27 %
Blasencarcinom (Mensch)	Klin. Wochenschr. **5**, Nr. 27, 1926	—10	+36	+16	45 %
Flexner-Jobl. Rattencarcinom	Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924	—7	+31	+17	55 %
Jensens Rattensarkom	Ebendaselbst **160**, 52, 1925	—9	+34	+16	47 %
Rous' Hühnersarkom	Ebendaselbst **160**, 307, 1925	—5	+30	+20	67 %
Rundzellen-Sarkom (Mensch)	Ebendaselbst **152**, 309, 1924	—5	+28	+18	64 %
Retina (Ratte)	Ebendaselbst	—31	+88	+26	30 %

Ich bemerke noch, daß sich sämtliche Zahlen der Tabelle auf frisch aus dem Körper entnommene Gewebe beziehen, nicht auf in vitro gezüchtete Gewebe.

III. Carcinome und Sarkome des Menschen.

Da die meisten menschlichen Krebse histologisch unrein sind, so gehören sie nicht in Tabelle I. Die auf das Gesamtgewicht bezogenen Werte von Q_{O_2}, $Q_M^{N_2}$ und U geben hier keine Auskunft über den Stoffwechsel der Krebszellen. Immerhin zeigt sich, daß auch diese unreinen Gewebe positive U-Werte liefern, und ferner, daß der prozentische Gärungsüberschuß $U/Q_M^{N_2}$ etwa ebenso groß ist, wie bei den Tumoren, die in bezug auf Krebszellen hundertprozentig sind.

Die Mittelwerte für 12 menschliche Carcinome (in Ringerlösung) waren[1]):

$$Q_{O_2} = -5, \qquad Q_M^{N_2} + 21,$$

also

$$U = +11, \quad \frac{U}{Q_M^{N_2}} = 52\%.$$

Dr. *H. A. Krebs* und *F. Kubowitz* haben in der letzten Zeit einige menschliche Carcinome in Carcinomserum gemessen und die in Tabelle II verzeichneten Werte gefunden:

Tabelle II.

Gewebe	Q_{O_2}	$Q_M^{N_2}$	U	$\frac{U}{Q_M^{N_2}}$
Mamma-Carcinom (Scirrhus), 20 bis 40% Krebszellen	— 2,6	+ 11,1	+ 5,9	53 %
Lebermetastase eines Gallenblasen-Ca 10 bis 20% Krebszellen	— 1,1	+ 13,6	+ 11,4	84 %
Haut-Carcinom, 50 bis 70% Zellen .	— 3,1	+ 13,8	+ 7,7	56 %
Lippen-Carcinom, 50 bis 70% Zellen	— 3,4	+ 16,3	+ 9,5	58 %
			Mittel:	**62 %**

U ist also auch für Krebszellen in Krebsserum positiv und prozentisch etwa ebenso groß wie in Ringerlösung.

Wäre ein Spontantumor mit Ursprungsgewebe statt mit Bindegewebe verunreinigt, etwa ein Darmcarcinom mit Darmepithel, so könnte der große negative U-Wert des normalen Epithels den positiven U-Wert der Carcinomzellen verdecken. Dann würde U negativ. Doch haben wir bisher solche Fälle nicht gefunden.

---

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924.

IV. Blutzellen.

Sowohl weiße Blutzellen[1]) als auch die roten Blutzellen der Säugetiere liefern positive *U*-Werte. Für die roten Blutzellen wird der prozentische Gärungsüberschuß sogar extrem groß, weil ihre Atmung verschwindend klein ist. Man mag die Blutzellen mit der Retina zu den Ausnahmen rechnen oder sie als frei lebende und im Kreislauf zugrunde gehende Zellen von den Geweben trennen.

V. Spontantumoren bei Inzuchtmäusen.

Murphy und *Hawkins*[2]) haben im Rockefeller-Institut 36 Spontantumoren von Inzuchtmäusen untersucht. Aus ihrer Tabelle entnehme ich, daß 13 Fälle positive *U*-Werte liefern, die übrigen Null- oder negative *U*-Werte. Ein Teil dieser Tumoren verhält sich also wie die bösartigen Tumoren des Menschen, ein Teil wie gutartige menschliche Tumoren oder wie sehr junges embryonales Gewebe, der Rest wie älteres embryonales Gewebe (etwa wie ein älterer Rattenembryo). Eine nähere Prüfung der letzterwähnten Fälle wäre erwünscht und insbesondere eine Angabe über den Grad der Verunreinigung mit Ursprungsgewebe (voraussichtlich Mammagewebe). Ehe man unter den Inzuchttumoren der Mäuse eine neuartige Klasse von Tumoren annimmt, wird man vor allem daran denken (vgl. III.), daß Verunreinigungen mit Ursprungsgewebe die Stoffwechseleigenschaften der Tumorzellen verdecken können.

VI. Andere Klassifizierung.

Wenn auch die Klassifizierung der Gewebe nach den *U*-Werten, ein Fortschritt ist, so möchte ich doch glauben, daß sie später durch eine Klassifizierung nach der Fähigkeit, anaerob zu leben und zu wachsen, abgelöst werden wird. Leider fehlen zurzeit noch die Methoden, um Lebens- und Wachstumsfähigkeit der Gewebe unter den Bedingungen der Anaerobiose messend zu vergleichen.

---

[1]) *W. Fleischmann* und *F. Kubowitz*, diese Zeitschr. **181**, 395, 1927.

[2]) Journ. Gen. Physiol. **8**, 115, 1925.

Untersuchungen über das durch Gärung gewonnene Hexose-mono-phosphat.

Von

C. Neuberg und J. Leibowitz.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Die Anschauung hat sich durchgesetzt, daß der typische *Hexose-di-phosphorsäure-ester* nicht als normales Zwischenprodukt der Gärung (und wohl auch nicht der Glykolyse) zu betrachten ist; denn selbst unter Verhältnissen, die Fragen der Permeabilität sicher ausschließen, nämlich in Hefesäften, vergärt unter den verschiedensten Bedingungen nach *C. Neuberg* und *M. Kobel*[1]) das Zymo-di-phosphat unvergleichlich langsamer als nicht phosphorylierter Zucker. Die Aufmerksamkeit hat sich deshalb dem von *A. Harden* und *R. Robison*[2]) im Jahre 1914 beobachteten und dann im Jahre 1922 von *Robison* mit großem Erfolge näher[3]) untersuchten *Hexose-monophosphorsäure-ester* zugewandt. Dieser Forscher (l. c.), ferner *A. L. Raymond*[4]) sowie *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*[5]) halten es für möglich, daß der Monoester die physiologische Durchgangsstufe darstellt, wobei die letzteren allerdings die Einschränkung machten, daß sein Vorläufer eine labile Modifikation ist, die erst bei der Isolierung des Mono-phosphats zu dem faßbaren Produkt[6]) stabilisiert wird. Nach den beiden letztgenannten Autoren soll eine hälftige Teilung des Mono-phosphorsäureesters in dephosphorylierten Zucker und Hexose-di-phosphat stattfinden, das unter Umständen dann als Schlacke liegen bleibt; es wäre dem-

---

[1]) *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. **166**, 488, 1925; **174**, 480, 1926.

[2]) *A. Harden* und *R. Robison*, Proc. Roy. Soc. **80**, 16, 1914.

[3]) *R. Robison*, Biochem. Journ. **16**, 809, 1922.

[4]) *A. L. Raymond*, Proc. Nat. Acad. of Sciences, **11**, 622, 1925; Chem. Centralbl. **1926**, I, 2013.

[5]) *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*, Naturwissenschaften **14**, 1277, 1926.

[6]) Eine ähnliche Meinung hat *H. Pringsheim* (diese Zeitschr. **156**, 111, 1925) für das Hexose-di-phosphat geäußert.

zufolge in dem früher von *C. Neuberg* betonten Sinne[1]) ein abnormes Erzeugnis, das sich bei Zufuhr ungewöhnlicher Mengen anorganischen Phosphats im Gärgute anhäuft. Die Verhältnisse werden nun durch die Annahme kompliziert, daß der Mono-phosphorsäure-ester von *Robison* nicht einheitlich, sondern ein Gemisch sein soll, in dem sowohl eine Aldohexose als eine Ketohexose als Phosphorsäure-ester enthalten wären. Für die Aldosenatur haben sich *Kluyver* und *Struyk*[2]) eingesetzt; das dem Di-phosphat zugrundeliegende Kohlenhydrat sprechen sie dagegen als eine 3-Ketohexose an. Nun sind aber gerade die bisher mit einiger Wahrscheinlichkeit als 3-Keto-hexosen[3]) betrachteten Zucker als nicht gärfähig erkannt, während die Hexose des auf dem Gärungswege gebildeten Mono-phosphorsäure-esters der alkoholischen Zuckerspaltung zugänglich ist. Freilich besteht dabei die Verwickelung, daß der Ester selbst auch in zellfreien Systemen unzweifelhaft langsamer vergärt als nicht phosphorylierte Glucose oder Fructose, wobei die Endrate der Vergärung nach den bisherigen, von *C. Neuberg* und *M. Kobel* gemachten Erfahrungen[4]) für die freien Kohlenhydrate größer ist als für den Ester. In verschiedener Hinsicht herrschen also bislang nicht behobene Unklarheiten in bezug auf die Frage, ob im Mono-phosphorsäure-ester wirklich das lange gesuchte obligatorische Zwischenprodukt der Gärung vorliegt. Es erscheinen uns nun drei Aufgaben als wichtig:

1. Die Methode zur Gewinnung des Esters ist ergiebiger zu gestalten.

2. Auf rein chemischem Wege ist der Grad seiner Einheitlichkeit festzustellen.

3. Die Vergärungsverhältnisse und Konstitution der auf chemischem wie enzymatischem Wege in Freiheit gesetzten Hexose sind zu prüfen.

---

[1]) *C. Neuberg* und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **78**, 238, 1916; **89**, 244, 1917; **103**, 320, 1920. (Oppenheimers) Handbuch der Biochemie, 2. Aufl., **3**, 454, 1924.

[2]) *A. J. Kluyver* und *A. P. Struyk*, K. Akad. van Wentensch. Amsterdam **29**, 322, 1926.

[3]) Im übrigen dürfte den konstitutionschemischen Hypothesen von *Kluyver* und *Struyk* inzwischen die Grundlage genommen sein; *W. N. Haworth* und *E. L. Hirst* [Journ. chem. Soc. (London) **1926**, S. 1858] haben nämlich durch den Nachweis des Amylenoxydringes im normalen Fruchtzucker, und des Butylenoxydringes in *Irvines* γ-Fructose gezeigt, daß weder der von den holländischen Autoren verlangte 2, 5-Ring in der gewöhnlichen Ketose noch der postulierte 2, 4-Ring in ihrer als labil vorausgesetzten Modifikation existiert. Damit haben die englischen Forscher die Aufstellung der Formeln unmöglich gemacht, auf die sich *Kluyver* und *Struyk* stützen.

[4]) *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. **179**, 451, 1926.

I. Darstellung des Hexose-mono-phosphorsäure-esters.

Nach den Angaben von *Robison* ist es wesentlich, die Zufügung von Zucker und sekundärem Natriumphosphat zum Hefensaft sorgfältig derart zu regeln, daß jede Zugabe die langsamer gewordene Kohlendioxyd-entwicklung wieder anfacht. Wir haben gefunden, daß eine ängstliche Innehaltung dieser Bedingungen nicht erforderlich ist. Es genügt, den alternierenden Zusatz von Zucker und sekundärem phosphorsauren Natrium so zu gestalten, daß im Gärkolben dauernd ein deutlicher Überdruck besteht und beim Schütteln ununterbrochen Kohlensäure entweicht. Die besten Resultate liefern Säfte mit kurzer Inkubationszeit, d. h. mit schnellem Vergärungsbeginn, aber nicht zu großem Vergärungsvermögen. Bei dem von uns verwendeten Material — Hefesäften zumeist aus untergäriger Bierhefe der *Schultheiß-Patzenhofer-Brauerei*, nach Angaben von *Lebedew* bereitet — dauerte die Operation bis zum Abbruch des Versuchs kaum jemals länger als 3 Stunden, nach erfolgter Angärung gewöhnlich 2 Stunden, wobei alle Prozeduren bei Raumtemperatur, d. h. unterhalb 22°, gewöhnlich bei 20° bis 21°, vorgenommen wurden. Höhere Wärmegrade sowie längere Digestionsdauer und starke Gärkraft verschieben anscheinend den Phosphorylierungsprozeß zugunsten der Bildung von Hexose-diphosphat.

Bei Berücksichtigung dieser Verhältnisse läßt sich die Aufarbeitung und ebenso die Ausbeute gegen die Vorschrift von *Robison* verbessern. *Robisons* Vorgehen ist kurz folgendes:

Das Gärgut wird mit Bariumacetat versetzt, mit Barytwasser neutralisiert und dann mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohols gefällt Durch Kochen des abgesaugten Niederschlags mit absolutem Alkohol wobei das Gemenge nicht unwesenlich stößt, wird nunmehr das Eiweiß denaturiert, das zusammen mit den Bariumsalzen der unveränderten anorganischen Phosphorsäure sowie der Hexose-di-phosphorsäure nebst der Hexose-mono-phosphorsäure niedergeschlagen war. Durch längeres Stehenlassen mit Alkohol vervollständigt man die Koagulation der Proteine. Dem getrockneten Niederschlage entzieht man durch Extraktion mit der zehnfacher Menge kalten Wassers zunächst organische Phosphorsäureverbindungen, hauptsächlich das Mono-phosphat. Aus dieser Flüssigkeit wird darauf mit Bleiessig das basische Bleisalz der Hexose-mono-phosphorsäure nebst der Bleiverbindung in Lösung gegangener Di-phosphorsäure niedergeschlagen. Die ausgewaschene Bleifällung wird nach Zerlegung mit Schwefelwasserstoff in das Gemisch der Bariumsalze verwandelt; deren Lösung wird jetzt von neuem mit Bleisubacetat gefällt. Die Bleiverbindungen sind abermals in die Bariumsalze überzuführen, die alsdann mit Alkohol gefällt, mit absolutem Alkohol gewaschen werden und sorgfältig zu trocknen sind. Darauf wird mit 10%igem Alkohol extrahiert, wobei jetzt überwiegend Monophosphat in Lösung geht. Unter Benutzung der Aminosäuren sowie Purinverbindungen fällenden Kraft des Quecksilber-



acetats[1]) wird hieraus ein hartnäckig anhaftender Rest stickstoffhaltiger Substanzen entfernt. Durch erneute Umwandlung in die Bleiverbindung, durch deren Zerlegung mit Schwefelwasserstoff und Überführung der freien Säure in das Bariumsalz, dessen wiederholte Extraktion mit 10%igem Weingeist sowie Ausfällung mit starkem Alkohol kann letzteres endlich analysenrein gewonnen werden.

Dieses Verfahren läßt sich nun, wie wir finden, folgendermaßen vereinfachen: Das zur Aufarbeitung kommende Gärgut wird zunächst mit Natronlauge gegen Phenolphthalein *genau* neutralisiert, dann wird es in einen Rundkolben übergeführt und im lebhaft siedenden Kochsalzbade für einige Minuten belassen, wobei eine Koagulation der Hefenproteine in groben Flocken erfolgt. Das ausgeschiedene Eiweiß wird abgeschleudert, wonach man ein spiegelklares goldgelbes Zentrifugat erhält. Durch Zusatz von hinreichend essigsaurem Calcium oder Barium und durch Erhitzen entfernt man nun alles anorganische Phosphat sowie die Hauptmenge gebildeten Hexose-di-phosphorsäureesters. Wegen der bekannten Schwerlöslichkeit der hexose-di-phosphorsauren Erdalkalien gelingt es, beim Sieden im Kochsalzbad jene Salze praktisch vollständig niederzuschlagen, und wenn man kochend heiß auf einer Saugnutsche filtriert, so geht keine nennenswerte Menge Di-phosphat mehr in Lösung. Es scheint auch andere Beimengungen bei der „Heiß-Fällung" mit niederzureißen. Die Entfernung von Diphosphat erfolgt so vollständig, daß eine im Vakuum oder *Faust-Heim*schen Verdunstungskasten *konzentrierte* Flüssigkeit mit normalem Bleiacetat nur noch eine Trübung gibt, wodurch die Abwesenheit nennenswerter Mengen Hexose-di-phosphorsäure-esters angezeigt wird.

Die weitere Verarbeitung geschieht nun so, daß man die nach Behandlung mit essigsaurem Calcium oder Barium erhaltene und mit diesen Erdalkalien keinen Niederschlag mehr liefernde Lösung direkt mit Bleiessig ausfällt. Wie so häufig vermindert ein wesentlicher Überschuß von Bleiessig die Ausbeute, indem er auf den zunächst erzeugten Niederschlag etwas lösend wirkt. Die Bleiessigfällung wird nach einigen Stunden abgesaugt oder weit besser zentrifugiert und in den Zentrifugenbechern selber mit destilliertem Wasser aufgerührt; dann wird abzentrifugiert und diese Waschung zwei- bis dreimal wiederholt. Der Bleiessigniederschlag wird darauf in einem Porzellanmörser mit destilliertem Wasser zu einem dünnen Brei angerieben und die Suspension in eine Glasflasche übergespült; nunmehr wird Schwefelwasserstoff eingeleitet. Das leicht abfiltrierbare Schwefelblei wird im Mörser verrieben, ebenfalls in Wasser aufgeschwemmt und mit H_2S behandelt, wobei anhaftende organische Phosphorsäure-verbindung abgegeben wird.

---

[1]) Vgl. *C. Neuberg* und *S. Lachmann*, diese Zeitschr. **24**, 173 und 429, 1910; *C. Neuberg* und *M. Ishida*, ebendaselbst **37**, 142, 1911.



Die beiden klaren Filtrate werden jetzt durch einen Luftstrom von Schwefelwasserstoff befreit und mit gesättigtem Barytwasser genau gegen Phenolphthalein neutralisiert. Ein dabei etwa auftretender Niederschlag wird durch Filtration beseitigt und die klare Flüssigkeit darauf im *Faust-Heim*schen Apparat in einer Emailleschale auf ein kleines Volumen gebracht. In der eventuell filtrierten Flüssigkeit gibt manchmal, aber keineswegs immer, normales Bleiacetat einen Niederschlag. Das Filtrat hiervon bzw. das durch Bleiacetat gar nicht fällbare Konzentrat wird nunmehr wieder mit Bleiessig ausgefällt. Die weitere Behandlung — Waschen auf der Zentrifuge und Zerlegen des Bleiessigniederschlags — ist die soeben angegebene. Aus der gegen Phenolphthalein mit *alkalifreiem* Barytwasser zu neutralisierenden Lösung fällt jetzt schon Alkohol (Volumen 1 : 1) recht reines hexose-monophosphorsaures Barium, das sich beim Stehen zusammenballt, gut absetzt und leicht auf der Nutsche abfiltriert werden kann; es ist sodann mit 50 %igem und schließlich mit absolutem Alkohol auszuwaschen. Es muß sich in kaltem Wasser klar lösen; die wässerige Lösung darf weder in stärkerer Konzentration noch in der Verdünnung beim Erwärmen eine Trübung geben und darf auch in 20 % Lösung nicht mit normalem Bleiacetat fällbar sein, darf also kein Di-phosphat einschließen. Ist dieses vorhanden, so ist nochmals aus verdünnter Lösung umzufällen.

Das so gewonnene Bariumsalz kann noch kleine Mengen stickstoffhaltiger Substanz enthalten, jedoch auch hiervon frei sein, je nach Art des Hefenmazerationssaftes. Der Stickstoffgehalt ist zumeist derart gering, daß bei Anstellung der *Lasseigne*schen Probe zunächst nur Grünfärbung erfolgt und sich erst beim Stehen Berliner Blau absetzt. Eine Analyse ergab 0,2 % N.

Der negative Ausfall der *Reaktionen auf Purine und Pentosen* bürgt dafür, daß die Verbindung weder Nucleinsäuren noch Nucleotide oder Nucleoside einschließt, die sich nach unseren früheren Beobachtungen[1]) dem auf biochemischem Wege gewonnenen Zucker-phosphat leicht beigesellen, wenn es in unzulänglicher Weise gereinigt wird.

Es ist zu hoffen, daß dieses vereinfachte Verfahren auch zu einer leichten Darstellung einheitlicher Substanzen führen wird, die Betriebsmaterialien der tierischen Gewebe bilden. Seit *Siegfrieds* Entdeckung der Phosphorfleischsäure vor mehr als 30 Jahren und des Carniferrins sowie späterhin des Lactacidogens durch *Embden* sind die Angaben über diese Substrate beträchtlichen Schwankungen unterworfen ge-

---

[1]) *C. Neuberg*, *E. Färber*, *A. Lewite* und *E. Schwenk*, diese Zeitschr. **88**, 259, 1917.



wesen. Schon *Siegfried*[1]) hat ihre Zugehörigkeit zur Gruppe phosphorhaltiger Kohlenhydrate und ihre Wichtigkeit als Energiestoff gewürdigt. Aber sie sind bald als N-haltig, bald als N-frei, bald als bekannte, bald als neue Verbindungen angesprochen. Soweit Gemische vorliegen, dürften sich die Typen der Mono- und Di-phosphate unschwer trennen lassen. Die ganze Frage ist nach *J. Greenwalds*[2]) bedeutungsvoller Entdeckung der *di-phosphorylierten l-Glycerinsäure* sowie des *Phosphagens* durch *P.* und *G. P. Eggleton*[3]) zu überprüfen; insbesondere schreiben die letztgenannten Autoren dem bisher übersehenen Phosphagen eine bedeutende Rolle für die Muskelchemie zu.

Die Erträge, die bei dem geschilderten Vorgehen erzielt werden, sind außerordentlich viel größer als bei *Robisons* Originalvorschrift. Wir und andere[4]) im hiesigen Institut haben bei Verwendung von 1 Liter Hefenmazerationssaft und (der mit der Gärgeschwindigkeit zu variierenden Menge) von 200 g Zucker sowie 130 g sekundärem Natriumphosphat ($Na_2HPO_4 + 12\,H_2O$) über 60 g Bariumsalz in einer Portion bequem darstellen können[5]).

Eine weitere Vereinfachung besteht darin, daß als zu veresterndes Kohlenhydrat *Rohrzucker* Verwendung finden darf, da er hinreichend schnell durch die Hefen-invertase hydrolysiert wird. Ein vergleichender Versuch mit Traubenzucker und mit Fructose als Ausgangsmaterial ergab, daß mit schnell angärendem Saft aus Glucose mehr organische Phosphorsäure-verbindungen entstanden als aus der Ketose, verschieden von den Angaben *Robisons*, der mit Fruchtzucker ein besseres Resultat verzeichnet. Freilich bleiben die von *Robison* erhaltenen Ausbeuten (*bezogen auf gleiche Mengen des in Reaktion gebrachten Kohlenhydrats*: 21 g aus Fructose und 10 g aus Glucose) in beiden Fällen so weit hinter den unsrigen zurück, daß ein Vergleich nicht ohne weiteres angängig ist. Bemerkenswert ist, daß *das gesamte von Glucose gebundene Phosphat als Hexose-mono-phosphat* in Erscheinung treten kann, während aus der Fructose zumeist eine deutliche Menge Hexose-di-phosphat daneben

---

[1]) Siehe *O. Hammarsten*, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 11. Aufl., S. 452, 1926.

[2]) *J. Greenwald*, Journ. of biol. Chem. **68**, 339, 1925; vgl. auch *H. Jost*, Verh. dtsch. Naturf. u. Ärzte, **1926**.

[3]) *E.* und *G. P. Eggleton*, Biochem. Journ. **21**, 190, 1927.

[4]) Frl. Dr. *M. Kobel*, mit der dieser Arbeitsweg ausgearbeitet wurde, gewann mit 200 g Rohrzucker, 150 g kristallisiertem Dinatriumphosphat und 1000 ccm Hefenmazerationssaft 92 g analysenreines hexose-monophosphorsaures Barium. Der Saft gor schnell an, aber dann mit mäßiger, konstanter Geschwindigkeit weiter.

[5]) Diese bisher nicht erreichten hohen Ausbeuten können vielleicht ein Argument zugunsten der Ansicht abgeben, daß dem Gärungsmonophosphat der Rang eines wichtigen Durchgangsgebildes zukommt.



entsteht. Dieses Verhalten bedarf noch der eingehenden Untersuchung, da, abhängig von den Züchtungsbedingungen und dem Zustande der Hefe, auch Säfte mit abweichendem Phosphorylierungs-vermögen im Verlauf unserer mehr als 60 Einzeldarstellungen beobachtet worden sind.

II.

Das amorphe Bariumsalz bietet nach der Art der Gewinnung keine Garantie für die Einheitlichkeit des zugrundeliegenden Hexose-mono-phosphats, jedoch würde für eine konstante Zusammensetzung zunächst der Umstand sprechen, daß man in praxi stets eine Substanz von gleichem spezifischen Drehungsvermögen erhält. Dieses bewegt sich in Übereinstimmung mit den Angaben von *Robison*, zwischen 24° und 26° für die freie Säure. Nun haben *C. Neuberg* und *O. Dalmer*[1]) gezeigt, daß die verschiedenen Zucker-phosphorsäure-ester mit den Alkaloiden charakteristische Salze liefern, und sie haben dieselben zur Charakterisierung der Zuckerphosphate empfohlen; man konnte also hoffen, durch Überführung in ein gut kristallisiertes Alkaloidsalz über die Individualnatur dieses Mono-phosphorsäure-esters Klarheit zu schaffen. Ein Brucinsalz, das *Robison* erwähnt, ist nach seinen Angaben nur *semikristallinisch* gewesen. Wir haben gefunden, daß das *Strychninsalz* (s. S. 503) außerordentlich gut und leicht kristallisiert. Bei etwas anderer Arbeitsweise als der von *Robison* eingeschlagenen, gewinnt man das *Brucinsalz* als eine völlig durchkristallisierte Masse, die unter dem Mikroskop ein gleichmäßiges Bild (prismatische Plättchen) liefert. Durch gestufte Kristallisation (s. S. 501) zerlegten wir das Salz in vier Fraktionen. Fraktion 1 bis 4 hatten gleichen Zersetzungspunkt und gleiche Drehung Das aus den Fraktionen 1 und 2 sowie 3 und 4 *regenerierte Bariumsalz* besaß das gleiche Drehungsvermögen, das infolge nunmehr größerer Reinheit um 1½° höher lag als das des ursprünglich als Ausgangsmaterial benutzten Bariumsalzes.

Die *Ausbeute an einheitlichem, kristallisiertem Brucinsalz macht 80% der Theorie aus*, berechnet auf die Menge, die aus dem erwähntermaßen noch stickstoffhaltigen Roh-Bariumsalz hervorgehen kann. Also mindestens zu diesem Prozentsatz ist das Hexose-mono-phosphat eine einheitliche Substanz.

Für diese Schlußfolgerung spricht auch das *Verhalten bei der titrimetrischen Ermittlung der Reduktionskraft.* Diese wurde vergleichsweise nach dem Kupfer-Verfahren von *Bertrand* und der jodometrischen Methode von *Willstätter-Schudel* sowie mit ihrer nach *Auerbach-Bodländer* modifizierten Form festgestellt. Wir fanden für den Mono-phosphorsäure-ester, berechnet auf die freie Säure, bei der *Bertrand*-

---

[1]) *C. Neuberg* und *O. Dalmer*, diese Zeitschr. **131**, 188, 1922.

Titration den Reduktionswert von 66 % der äquivalenten Menge Traubenzucker. Die jodometrische Bestimmung ergab uns einen um 8 % niedriger liegenden Wert, wobei beide Jod-Verfahren dasselbe[1]) Ergebnis lieferten.

Da beim *Kochen* mit *Fehling*scher Lösung einerseits, bei Behandlung mit Hypojodit- bzw. Jod-Bicarbonat-lösung in der *Kälte* andererseits der *Angriff des Mono-phosphorsäure-esters auf ganz verschiedene Weisen* erfolgt *und seine Hydrolyse in ungleichem Grade* vor sich geht (s. S. 499), so möchten wir auf jene Differenzen vorerst keinen entscheidenden Wert legen.

Hinzu kommt, daß auf verschiedene Arten *künstlich phosphorylierte Fructose* (Versuche von Herrn cand. phil. *K. P. Jacobsohn*) auffallenderweise nach beiden Jod-titrationsverfahren einen 15- bis 27 %igen Jodverbrauch aufweist, ohne daß etwa Fruchtzucker in Glucose umgelagert wird. Der Eintritt der Phosphorsäuregruppe scheint also die Oxydierbarkeit zu erhöhen.

III.

Um Anhaltspunkte hinsichtlich der Natur der im Mono-phosphorsäure-ester enthaltenen Hexose zu gewinnen, versuchten wir eine Abspaltung des Phosphorsäure-restes unter möglichst schonenden Bedingungen durchzuführen. *R. Robison* beschreibt eine enzymatische Hydrolyse durch Emulsin und eine Verseifung mit verdünnter Schwefelsäure; in beiden Fällen konnte er im Hydrolysat d-Glucose als Glucosazon nachweisen, ohne jedoch die Möglichkeit der Anwesenheit auch anderer Zucker auszuschließen. Da dem Emulsin nur ausnahmsweise eine energisch wirksame Phosphatase beigemischt ist, führten wir die enzymatische Spaltung mit „Taka-Diastase“ aus, nachdem sich der hohe Gehalt derselben an *Phosphatase*[2]) durch mehrere einschlägige Arbeiten des hiesigen Instituts herausgestellt hat. Der Verlauf der Einwirkung läßt sich sowohl durch Ermittlung der abgespaltenen Phosphorsäure als auch durch Bestimmung der Reduktionszunahme verfolgen. Das aus dem eingeengten Hydrolysat mit Alkohol extrahierte Kohlenhydrat bzw. das Zuckergemisch wurde polarimetrisch und reduktometrisch untersucht. Wir fanden nach dem Jod-Verfahren (*Auerbachs* Modifikation) um etwa 15 % niedrigere Werte als nach dem Kupfer-Ver-

---

[1]) Dabei ist jedoch folgendes zu beachten: Nach Möglichkeit ist bei dem Verfahren von *Willstätter* und *Schudel* ein Überschuß von NaOH über die bei Berechnung der Fructose als Glucose benötigten 3 Mol zu vermeiden! Bei stärkerer Alkalinität wird Fructose in steigendem Maße unter Jodverbrauch angegriffen, vielleicht nach voraufgegangener Umlagerung. Jedoch ist Fruchtzucker gegen Jod in Soda-Bicarbonatlösung praktisch beständig. Belege siehe im experimentellen Teile S. 500.

[2]) Literatur siehe bei *C. Neuberg* und *E. Simon*, *Phosphatasen*, in Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmethod., Abt. IV, Teil 1, S. 615, 1927.

fahren; doch läßt sich diese Divergenz nicht durch die Annahme des Vorliegens eines Gemischs aus 85 % Glucose und 15 % Fructose erklären, da die unter dieser Voraussetzung berechneten Drehwerte weit höher als die experimentell gefundenen liegen müßten. Bei der Osazonprobe erhielten wir neben reichlichen Quantitäten Glucosazon geringe Mengen eines in heißem Wasser sowie in kaltem Alkohol und Aceton löslichen Produktes. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Wasser besaß es einen Zersetzungspunkt von etwa 170°; leider reichten die bisher isolierten Mengen noch nicht für eine genauere Untersuchung aus.

Das Verhalten des enzymatisch in Freiheit gesetzten Zuckers bei der Vergärung war nicht wesentlich verschieden von dem der Glucose und Fructose. Er vergor manchmal etwas beschleunigt, doch waren die Differenzen nicht ausgesprochener, als sie zwischen den beiden normalen Zymohexosen gegenüber diversen Hefensorten auch sonst zutage treten.

Als weniger günstig für die Untersuchung der in Frage kommenden Hexose stellte sich die Säurehydrolyse heraus. Hierbei erfolgt beträchtliche Zerstörung des abgespaltenen Zuckers, so daß wir wegen eintretender Dunkelfärbung stets vor Erreichung einer 50 %igen Zerlegung die Hydrolyse abbrachen. Im Alkoholextrakt konnte nur ein Bruchteil derjenigen Zuckermenge nachgewiesen werden, die unter Zugrundelegung des aus der Phosphatablösung berechneten Spaltungsgrades erwartet werden müßte. Das Verhältnis des Reduktionsvermögens gegen Kupferoxydsalz und Jod wich bei diesem Zucker von dem für das Enzymhydrolysat ermittelten Wert ab und näherte sich 1; vielleicht war vorhanden gewesene Ketose zerstört. Jedoch wies auch dieses Produkt den auffallend niedrigen Drehungswert auf. Bei der Vergärung zeigten sich keine Besonderheiten; Gärgeschwindigkeit und Gärumfang wichen nur wenig von den entsprechenden Werten für Glucose und Fructose ab.

Wir gewinnen somit den allgemeinen Eindruck, daß der *Robison*sche Mono-phosphorsäure-ester zum weitaus größten Teile (mindestens zu 80 bis 90 %) einen einheitlichen Körper darstellt, aus dem sich jedoch die Phosphorsäure nicht abspalten läßt, ohne daß der Zuckerrest Umformungen irgendwelcher Art erfährt. Die Möglichkeit solcher Umlagerungen, selbst bei der enzymatischen Hydrolyse, ist gegeben, da wir nach den Daten von *O. Neuberg* und *A. Gottschalk*[1]) über den Kohlenhydratumsatz in Leber- und Muskelzellen sowie nach denen von *O. Meyerhof*[2]) über die Glykolyse ein abweichendes Verhalten von

[1]) *C Neuberg* und *A Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 164, 1924.
[2]) *O. Meyerhof*, Naturw. **14**, 756, 1926; diese Zeitschr. **178**, 462, 1926.

freiem Zucker und Zucker-phosphaten feststellen und in den Phosphorsäure-estern eine spezielle und noch nicht identifizierte reaktionsfähige[1]) Form der Hexose voraussetzen müssen.

Beschreibung der Versuche.

Wir führen hier lediglich die Ergebnisse von vier Ansätzen zur Darstellung des Hexose-mono-phosphats nach der oben beschriebenen Methode an.

Ansatz jeweils mit 1000 ccm Hefensaft und 200 g Rohrzucker.

1. Induktionszeit $1^1/_4$ Stunden, Operationsdauer $2^3/_4$ Stunden, Zusatz von 140 g $Na_2HPO_4 + 12\,H_2O$; Ausbeute 18 g Bariumsalz.

$$[\alpha]_D = +\,11{,}8^0$$
$$(\alpha = +\,0{,}82^0,\;\; l = 2,\;\; c = 3{,}468).$$

Für die *freie Säure* war

$$[\alpha]_D = +\,24{,}2^0$$
$$(\alpha = +\,0{,}69^0,\;\; l = 2,\;\; c = 1{,}423),$$

bestimmt mit einer Lösung des Bariumsalzes in der äquivalenten Menge Salzsäure.

2. Induktionszeit $^3/_4$ Stunden, Reaktionsdauer 3 Stunden, Phosphatzugabe 145 g; Ausbeute 34 g Bariumsalz.

Für die *freie Säure*

$$[\alpha]_D = +\,23{,}7^0$$
$$(\alpha = +\,0{,}79^0,\;\; l = 2,\;\; c = 1{,}655).$$

3. Induktionszeit 20 Minuten, Reaktionsdauer $2^1/_4$ Stunden, zugefügtes Phosphat 130 g; Ausbeute 62 g Bariumsalz.

Für die freie Säure

$$[\alpha]_D = +\,24{,}6^0$$
$$(\alpha = +\,0{,}63^0,\;\; l = 1,\;\; c = 2{,}560).$$

4. Induktionszeit $1\,^1/_2$ Stunden, Reaktionsdauer $3^1/_4$ Stunden, Phosphatzugabe 120 g; Ausbeute 21 g Bariumsalz.

Für die *freie Säure* war

$$[\alpha]_D = +\,24{,}7^0$$
$$(\alpha = +\,0{,}67^0,\;\; l = 2,\;\; c = 1{,}358).$$

---

[1]) Wir möchten besonders für den von *C. Neuberg* und *M. Kobel* (Zeitschr. f. angew. Chem. 38, 761, 1925) vorgeschlagenen Namen *am-Form* plädieren. Denn „am" als Abkürzung für *alloiomorph* bringt nicht nur die Verschiedenheit vom gewöhnlichen stabilen Produkt zum Ausdruck, sondern gibt auch das „Fließende", die Möglichkeit zur Annahme verschiedener Gestalten, wieder.

Analysen mehrerer Präparate des Bariumsalzes.

Für die Analysen wurde die Substanz bei 70° über P_2O_5 im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,1650 g	Substanz	lieferten	0,0961 g	$BaSO_4$	=	34,3 % Ba
0,1192 g	„	„	0,0700 g	$BaSO_4$	=	34,6 % Ba
0,1313 g	„	„	0,0759 g	$BaSO_4$	=	34,0 % Ba
0,1982 g	„	„	0,0555 g	$Mg_2P_2O_7$	=	7,8 % P
0,2566 g	„	„	0,0710 g	$Mg_2P_2O_7$	=	7,7 % P

Kolorimetrische Phosphorbestimmungen wurden nach voraufgegangener Soda-Salpeter-Schmelze der Substanz, Abrauchen mit H_2SO_4 und Filtration oder nach Zerstörung der organischen Substanz mit saurem Wasserstoffsuperoxyd nach der gerade für Zucker-phosphat schon vor längerer Zeit[1]) empfohlenen Methode von *J. A. Mandel* und *C. Neuberg* vorgenommen; sie zeigten mit dem durch *K. Lohmann* und *L. Jendrassik*[2]) verbesserten Verfahren von *Bell* und *Doisy* bzw. von *Fiske* und *Subbarow* in verschiedenen Präparaten: 7,4, 7,3, 7,9, 7,3 % P an.

$C_6H_{11}O_9 . PBa$: Ber. Ba = 34,75; P = 7,85 %.

Präparat 1 war stickstofffrei.

Eine Kjeldahlbestimmung an dem Gemisch der drei anderen Präparate ergab: 0,21 % N. (0,3917 g Substanz verbrauchten 0,6 ccm n/10 H_2SO_4.)

Reduktionsvermögen der Hexose-mono-phosphorsäure.

0,8307 g Bariumsalz, entsprechend 0,5470 g freier Säure, wurden in Wasser gelöst und mit Na_2SO_4 versetzt; das ausgeschiedene $BaSO_4$ wurde abfiltriert und das Filtrat auf 100 ccm aufgefüllt.

α) Zuckerbestimmung nach *Bertrand*:

Aus	3 ccm	15,7 mg	Cu	entsprechend	68,2 %	des Reduktionsvermögens
„	5 „	25,7 „	Cu	„	67,0 %	der äquivalenten Menge
„	10 „	49,0 „	Cu	„	66,8 %	Glucose.

β) Zuckerbestimmung nach *Willstätter* und *Schudel*: 10 ccm verbrauchten 2,55 ccm n/10 J = 60,9 % der Reduktion von Glucose.

γ) Zuckerbestimmung nach *Auerbach* und *Bodländer*: 10 ccm verbrauchten 2,50 ccm n/10 J = 59,7 % der Reduktion von Glucose.

Unterschiedlicher Verseifungsgrad des Mono-esters bei den Reduktionsbestimmungen nach Bertrand und nach Willstätter-Schudel.

0,78 g Ba-Salz wurden in wässeriger Lösung mit Na_2SO_4 umgesetzt, filtriert und auf 25,0 ccm aufgefüllt.

---

1) *J. A. Mandel* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **71**, 196, 1915; vgl. *C. Neuberg* und *M. Kobel*, ebendaselbst **179**, 473, 1926.

2) *K. Lohmann* und *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. **178**, 419, 1926.

Je 10,0 ccm wurden vorschriftsmäßig nach *Bertrand* und nach *Willstätter-Schudel* behandelt.

1. Die vom Cu_2O getrennte Lösung wurde mit viel NH_4Cl, dann mit Magnesiamischung versetzt und filtriert; der Niederschlag wurde mit verdünntem NH_3, dann mit Wasser gewaschen, in verdünntem H_2SO_4 gelöst und kolorimetriert.

Gefunden: 39,9 mg P_2O_5 = 71 % der theoretisch abspaltbaren Menge.

2. Die mit Na-Hypojodit titrierte Flüssigkeit wurde in derselben Weise aufgearbeitet.

Gefunden: 5,0 mg P_2O_5 = 9 %.

Wie man sieht, wird beim Kochen mit *Fehling*scher Mischung ungefähr achtmal so viel Phosphorsäure frei, als bei Einwirkung von Hypojodit in der Kälte, so daß jeweils ganz verschiedene Mengen dephosphorylierten Zuckers der Einwirkung des Alkalis und des Oxydationsmittels ausgesetzt sind. Analoge Verhältnisse walten auch bei den übrigen Zucker-phosphorsäure-estern ob und dürfen daher (s. S. 496) nicht unberücksichtigt bleiben.

Joaometrische Bestimmungen in etwa 1 %*igen Fructoselösungen* (vgl. S. 496).

Lösung I. Reduktionsvermögen nach *Bertrand*: Aus 5 ccm 81,5 mg Cu = 42,2 mg Zucker = 0,84 %. Drehung: $\alpha = -1{,}56^0$, $l = 2$. Da $[\alpha]_D = -92^0$, so ist die Fruchtzuckerkonzentration = 0,85 %.

Lösung II. Reduktionsvermögen nach *Bertrand*: Aus 2 ccm 39,7 mg Cu = 19,7 mg Zucker. Fructosegehalt = 0,985 %.

Angewandte Lösung in ccm	n/10 J ccm	Alkali ccm	Jodverbrauch ccm
1 I	1	1,5 *W**)	0,03
2 I	3	4,5 *W*	0,11
2 I	3	20 *A**)	0,05
5 I	8	12 *W*	0,17
5 I	8	50 *A*	0,09
7 I	10	15 *W*	0,35
7 I	10	70 *A*	0,08
10 I	10	15 *W*	0,38
10 I	10	100 *A*	0,05
10 I	20	30 *W*	0,62
5 II	5	50 *A*	0,00
5 II	10	100 *A*	0,07
5 II	5	7,5 *W*	0,03
5 II	5	20 *W*	0,50
5 II	10	15 *W*	0,15
5 II	10	30 *W*	0,65
5 II	10	40 *W*	0,60

*) *W* = n/10 NaOH nach *Willstätter-Schudel*, *A* = Soda-Bicarbonat nach *Auerbach-Bodländer*.

Fällbarkeit der Hexose-mono-phosphorsäure.

Außer durch Bleisubacetat wird der Mono-phosphorsäure-ester auch nach *Salkowski-van Slyke-Clausen* durch Kupfersulfat plus Calciumhydroxyd niedergeschlagen, und zwar quantitativ.

Ebenso verhalten sich übrigens Zymo-di-phosphat sowie die hieraus und aus Rohrzucker-phosphorsäure bereiteten *Neuberg*schen Hexosen-mono-phosphorsäure-ester[1]).

Brucinsalz der Hexose-mono-phosphorsäure.

5,1 g Bariumsalz wurden in wässeriger Lösung mit einer heiß gesättigten Lösung von etwas weniger als der berechneten Menge Brucinsulfat versetzt. Die vom Bariumsulfat abfiltrierte Flüssigkeit hinterließ beim vorsichtigen Eindunsten eine halb kristallinische strahlige Masse. Sie wurde in wenig Wasser aufgenommen und die Lösung von einer zurückbleibenden geringen Trübe abfiltriert. Die fraktionierte Kristallisation ließ sich nach folgendem Verfahren ausführen:

Man versetzt die wässerige Lösung, wie dieses schon *Robison* getan hat, mit Aceton bis zur beginnenden Trübung und kühlt auf 0^0 ab. Nachdem sich eine kleine Menge Kristalle abgeschieden hatte und die überstehende Flüssigkeit völlig klar geworden war, erhöhten wir jetzt die Acetonkonzentration vorsichtig, indem sorgfältig darauf geachtet wurde, daß durch die fortgesetzte Acetonzugabe keine Ausfällung eintrat. Man kann die sich freiwillig abscheidenden Kristalle zu einer beliebigen Zeit abfiltrieren und die Mutterlauge in derselben Weise weiterbehandeln. Auf diesem Wege wurden vier Fraktionen kristallisierter Substanz erhalten.

Fraktion 1 = 2,1 g.

$$[\alpha]_D = -22{,}5^0$$
$$(\alpha = -1{,}48^0,\ l = 2,\ c = 3{,}302).$$

Fraktion 2 = 4,7 g.

$$[\alpha]_D = -22{,}9^0$$
$$(\alpha = -1{,}24^0,\ l = 2,\ c = 2{,}710).$$

Fraktion 3 = 1,6 g.

$$[\alpha]_D = -22{,}1^0$$
$$(\alpha = -1{,}29^0,\ l = 2,\ c = 2{,}925).$$

Nach der dritten Kristallisation war die Acetonkonzentration auf etwa 90% gestiegen. Die Mutterlauge wurde im Vakuum ein-

[1]) *C. Neuberg* und *E. Kretschmer*, diese Zeitschr. **36**, 13, 1911; *C. Neuberg*, ebendaselbst **88**, 432, 1918; *C. Neuberg* und *S. Sabetay*, ebendaselbst **162**, 479, 1925.



gedampft, der Rückstand in möglichst wenig Wasser aufgenommen, die Lösung filtriert und wieder in der oben beschriebenen Weise mit Aceton behandelt. Es wurde eine vierte Kristallfraktion gewonnen, die 2,2 g wog.

$$[\alpha]_D = -22{,}2^0$$
$$(\alpha = -0{,}93^0,\ l = 2,\ c = 2{,}094).$$

Versuche, aus dem Filtrat dieser Fraktion weitere Kristalle zur Abscheidung zu bringen, scheiterten. Insgesamt wurden also 10,6 g an offenbar einheitlicher kristallisierter Substanz erhalten = 80% der Theorie.

In *50% Alkohol* (statt in Wasser) wurden nachstehende Drehwerte ermittelt:

Gemisch der Fraktionen 1 und 2:

$$[\alpha]_D = -18{,}8^0$$
$$(\alpha = -0{,}92^0,\ l = 2,\ c = 2{,}445).$$

Gemisch der Fraktionen 3 und 4:

$$[\alpha]_D = -18{,}4^0$$
$$(\alpha = -0{,}53^0,\ l = 2,\ c = 1{,}442).$$

Analyse des Brucinsalzes: 0,3238 g Substanz: 0,0331 g $Mg_2P_2O_7$.
0,1020 g Substanz: 4,6 ccm N (33% KOH, 753 mm, 19⁰).

$(C_{23}H_{26}N_2O_4)_2 . C_6H_{11}O_5 . PO_4H_2$ (1048). Ber.: P = 2,96%; N = 5,35%.
Gef.: P = 2,85%; N = 5,15%.

Das Brucinsalz kristallisiert in prismatischen Plättchen. Alle Fraktionen verhielten sich im Schmelzröhrchen gleichmäßig: Verfärbung ab 145⁰, Sinterung bei 155 bis 160⁰, Zersetzung bei etwa 170⁰.

Rücküberführung des Brucinsalzes in das Bariumsalz.

Der Versuch wurde getrennt mit den Brucinsalz-fraktionen 1 und 2 (5,5 g) einerseits und 3 und 4 (3,0 g) andererseits vorgenommen. Die auf 0⁰ gebrachte wässerige Lösung wurde mit einer abgekühlten gesättigten Lösung alkalifreien Baryts versetzt. Es schied sich sofort freies Brucin aus; nach kurzem Stehen im Eisschrank erstarrte die ganze Flüssigkeit zu einem Kristallbrei. Nun wurde auf der Nutsche abgesaugt, der Niederschlag mehrfach mit Eiswasser nachgewaschen, das Waschwasser mit dem Filtrat vereinigt, die Flüssigkeit mit Chloroform ausgeschüttelt und die wässerige Lösung abgehoben. Das überschüssige Bariumhydroxyd wurde sofort durch Einleiten von Kohlendioxyd entfernt, das Filtrat im Vakuum eingeengt und mit Alkohol gefällt. Zur Reinigung wurde das Bariumsalz in wenig Wasser auf-

genommen, wobei es sich klar löste, und nochmals mit Alkohol gefällt. Ausbeute an Bariumsalz 1,8 bzw. 0,9 g, d. h. fast quantitativ.

α) $[\alpha]_D = +25{,}9^0$

$(\alpha = +0{,}49^0, \; l = 2, \; c = 0{,}947)$.

β) $[\alpha]_D = +25{,}5^0$

$(\alpha = +0{,}63^0, \; l = 2, \; c = 1{,}236)$.

(In beiden Fällen war die Substanz in der äquivalenten Menge Salzsäure gelöst.)

Analyse des regenerierten Bariumsalzes:

0,0851 g Substanz: 0,0499 g $BaSO_4$,
0,1908 g „ 0,0520 g $Mg_2P_2O_7$.

$C_6H_{11}O_5 . PO_4Ba$. Ber.: Ba = 34,75 %; P = 7,85 %.
Gef.: Ba = 34,60 %; P = 7,61 %.

Reduktionsvermögen.

0,2420 g Substanz, gelöst in 10 ccm Wasser:

α) Reduktion nach *Bertrand*:

Aus 3 ccm 43,8 mg Cu entsprechend 66,5 % der Reduktionskraft der äquivalenten Menge Glucose.

β) Reduktion nach *Auerbach*:

3 ccm verbrauchten 2,10 ccm n/10 J entsprechend 57,5 % der Reduktionskraft der entsprechenden Menge Glucose.

Strychninsalz der Hexose-mono-phosphorsäure.

Die Darstellung geschah aus 5,6 g Bariumsalz, wie wir es beim Brucinsalz beschrieben haben. Das Strychninsalz besitzt eine viel geringere Wasserlöslichkeit und setzt sich demgemäß bereits beim Einengen der wässerigen Lösung teilweise in schön ausgebildeten Kristallen ab, die jedoch nicht rein sind. Denn das Strychninsalz neigt in höherem Maße als das Brucinsalz zum hydrolytischen Zerfall; die wässerige Lösung trübt sich leicht unter Abscheidung von freiem Alkaloid. Die fraktionierte Kristallisation wurde deshalb so vorgenommen, daß die wässerige Lösung unter dauernder Hinzufügung von Alkohol bis zum dünnen Sirup eingedunstet wurde. Aus diesem sonderte sich beim Stehen im Eisschrank eine Kristallschicht ab, die durch Verreiben der gesamten Masse mit verdünntem Alkohol von dem sirupösen Rest abgetrennt wurde. Durch Lösen in Wasser, Wiedereinengen unter Alkoholzugabe wird diese Fraktion rein erhalten. Aus der Mutterlauge konnten durch fraktionierten Acetonzusatz nach der beim Brucinsalz angegebenen Weise zwei weitere Kristallfraktionen

erzielt werden; sie müssen nach Aussehen und ihren Drehwerten mit der ersten als identisch betrachtet werden. Drehungen in 50%igem Alkohol:

1. 2,0 g; $[\alpha]_D = -22{,}0^0$
$(\alpha = -0{,}58^0, \; l = 2, \; c = 1{,}318)$.

2. 1,9 g; $[\alpha]_D = -21{,}4^0$
$(\alpha = -0{,}34^0, \; l = 2, \; c = 0{,}795)$.

3. 2,8 g; $[\alpha]_D = -21{,}3^0$
$(\alpha = -0{,}38^0, \; l = 2, \; c = 0{,}891)$.

Die Gesamtausbeute an einheitlich kristallisierter Substanz betrug 6,7 g = 52% der Theorie.

Das Strychninsalz kristallisiert in wohlausgebildeten, bereits mit dem bloßen Auge erkennbaren Nadeln, die meist zu Kristalldrusen angeordnet sind. (Ob das zur Gewichtskonstanz getrocknete Salz Kristallwasser enthielt, ist nicht entschieden.)

0,0914 g Substanz: 4,5 ccm N (33% KOH, 753 mm, 19°).
0,2910 g „ 0,0321 g $Mg_2P_2O_7$.
$(C_{21}H_{22}N_2O_2)_2 \cdot C_6H_{11}O_5 \cdot PO_4H_2$ (928). Ber.: N = 6,04%; P = 3,34%,
Gef.: N = 5,66%; P = 3,12%.

Rücküberführung des Strychninsalzes in das Bariumsalz.

Aus 5,5 g Strychninsalz, die in der für Brucinsalz angegebenen Weise behandelt wurden, konnten 1,6 g Bariumsalz wiedergewonnen werden. Für die freie Säure fanden wir wiederum:

$$[\alpha]_D = +25{,}3^0$$
$$(\alpha = +0{,}49^0, \; l = 2, \; c = 0{,}970).$$

Vergleichende Phosphorylierungen von Glucose und Fructose.

1. Versuch. In zwei zur selben Zeit und unter identischen Bedingungen nebeneinander angestellten Versuchen wurden je 4 g Glucose und Fructose in je 20 ccm eines schnell angärenden Saftes mit je etwa 1 g Dinatriumphosphats verestert. Dauer der Reaktion 1¾ Stunden. Beide Lösungen wurden nun gegen Phenolphthalein mit Natronlauge genau neutralisiert und zwecks Ausfällung der Eiweißstoffe im Kochsalzbade zum Sieden erhitzt. Dann wurde zentrifugiert, der Niederschlag nachgewaschen, das Waschwasser mit den Filtraten vereinigt und auf je 100 ccm aufgefüllt. Von den so erhaltenen klaren Lösungen wurden mit aliquoten Teilen kolorimetrische Phosphorbestimmungen vorgenommen:

a) *Die Bestimmung des anorganischen Phosphats* geschah ohne Vorbehandlung der Lösung.

b) *Bestimmung des Hexose-di-phosphats*:

Hierzu wurde eine Probe der Lösung im Vakuumexsikkator konzentriert, mit überschüssiger Bariumacetatlösung in der Siedehitze gefällt und heiß filtriert. Der Niederschlag wurde mit wenig kochendem Wasser nachgewaschen; er enthielt alles anorganische sowie das als Hexose-di-phosphat gebundene Phosphat. Die gesamte Menge fester Substanz wurde in verdünnter Salpetersäure gelöst und mit Na_2SO_4 umgesetzt; die Flüssigkeit wurde nach dem Abfiltrieren des $BaSO_4$ mehrfach mit konzentrierter Salpetersäure und Schwefelsäure, zuletzt mit dieser allein abgeraucht. Die Differenz aus der in diesem Anteil kolorimetrisch ermittelten Phosphatmenge und der nach 1. gefundenen ergibt angenähert die Menge des Hexose-di-phosphats.

c) *Die Bestimmung des Hexose-mono-phosphats* geschah im Filtrat von der Bariumacetat-heiß-fällung nach der Umsetzung mit Na_2SO_4 und Zerstörung durch Salpetersäure/Schwefelsäure.

d) *Eine Bestimmung der Gesamtphosphorsäure* erfolgte in der ursprünglichen Lösung nach der Behandlung mit Salpetersäure/Schwefelsäure. Die Summe der nach b + c gefundenen Phosphatzahlen muß mit dem nach d) ermittelten Wert übereinstimmen.

Nachstehend die Ergebnisse:

	Ansätze mit			
	Glucose		Fructose	
	mg	%	mg	%
a) Anorganisches P_2O_5	1) 215,2 2) 211,1 Mittel 213,1	43,6	1) 354,5 2) 349,7 Mittel 352,1	69,2
b) P_2O_5 in der Ba-Fällung . . .	1) 211,4 2) 200,2 Mittel 205,9	42,2	1) 389,0 2) 397,8 Mittel 393,4	77,4
P_2O_5 in Hexosediphosphatbindung (b bis a)	(— 7,2)	0,0	41,3	8,2
c) P_2O_5 im Filtrat von b (Hexose-mono-phosphat)	1) 272,0 2) 264,7 Mittel 268,3	54,9	1) 98,8 2) 106,1 Mittel 102,4	20,1
d) Gesamt-P_2O_5	1) 485,6 2) 491,3 Mittel 488,5	100	1) 511,2 2) 506,0 Mittel 508,6	100
b + c	474,2	97,1	495,8	97,5

Enzymatische Hydrolyse der Hexose-mono-phosphorsäure.

Die Zerlegung durch das Takaferment verläuft analog der von *Robison* beschriebenen Emulsinspaltung, jedoch entsprechend dem

höheren Phosphatasereichtum unseres Fermentpräparats mit wesentlich größerer Geschwindigkeit.

1. Versuch. Versuchslösung: Na-Salz aus 3,85 g Ba-Salz + wässeriger Auszug aus 0,3 g Takadiastase, aufgefüllt auf 100 ccm.

Kolorimetrische P-Bestimmung.

Zeit in Stunden	Freies P_2O_5 mg	Abgesp. P_2O_5 in % des Gesamt-P_2O_5
0	0	0
24	162	23,4
72	290	56,4
144	518	74,9

Der gebildete freie Zucker wurde nach dem Eindampfen der Lösung durch Alkohol extrahiert und in 50 ccm wässeriger Lösung reduktometrisch und polarimetrisch untersucht.

Reduktion nach *Bertrand*:

Aus 2 ccm 89,3 mg Cu, entsprechend 46,6 mg Glucose. Die Lösung enthielt somit 2,33 % Hexose (als Glucose berechnet) = 1,165 g oder 88 % des aus der Phosphat-ablösung berechneten Quantums.

Auf Grund dieses Reduktionswertes würde sich die spezifische Drehung[1]) zu

$$[\alpha]_D = +11{,}2^0,$$
$$(\alpha_D = +0{,}52^0,\ l = 2,\ c = 2{,}33)$$

ergeben.

Jod-Reduktionsvermögen nach *Willstätter-Schudel*:

2 ccm verbrauchen 4,25 ccm n/10 J, entsprechend 38,3 mg Aldose.

Nach *Auerbach-Bodländer*:

2 ccm verbrauchen 4,15 ccm J, entsprechend 37,3 mg Aldose.

Das Jod-Reduktionsvermögen bleibt um etwa 18 % hinter dem Reduktionsvermögen für Kupferoxyd zurück.

2. Versuch. Versuchslösung: 4,55 g Ba-Salz + wässeriger Auszug aus 0,3 g Takadiastase, aufgefüllt auf 100 ccm. Schneller Ausfall von gelatinösem Bariumphosphat[2]).

Reduktion nach *Bertrand* (Titrationen mit je 2 ccm).

Zeit in Tagen	mg Cu	Glucose in % des Gesamt-kohlenhydrats
0	56,8	69,3
5	72,0	90,5

In einem vom ausgefallenen Ba-Phosphat abfiltrierten aliquoten Teile der Lösung wurde nach Zerstörung der organischen Substanz die ver-

[1]) Über d-Glucose mit ganz niedrigem spezifischen Drehungsvermögen s. *H. Ost*, (Ber. **46**, 2995, 1913) sowie *H. Ost* und *L. Wilkening* (Chem.-Ztg. **34**, 461, 1910).

[2]) Vgl. *K. Djenab* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **82**, 393, 1917.

bliebene Phosphatmenge kolorimetrisch bestimmt: die Lösung enthielt noch 0,2450 g P_2O_5 = 30,0 % des Gesamt-P_2O_5, entsprechend einer Spaltung zu 70,0 %.

Der mit Alkohol ausgezogene Zucker wurde in 50 ccm wässeriger Lösung untersucht.

Reduktion nach *Bertrand*:

Aus 2 ccm 67,9 mg Cu, entsprechend 37,8 mg Glucose.

Die Lösung ist somit, berechnet auf Glucose, 1,74 %. Daher wäre

$$[a]_D = +\ 12,9^0,$$
$$(a = +\ 0,45^0,\ l = 2,\ c = 1,74).$$

Reduktion nach *Willstätter-Schudel*:

2 ccm verbrauchen 3,25 ccm n/10 J, entsprechend 29,3 mg Glucose.

Reduktion nach *Auerbach-Bodländer*:

2 ccm verbrauchen 3,20 ccm n/10 J, entsprechend 28,8 mg Glucose.

Säurehydrolyse der Hexose-mono-phosphorsäure.

Aus 5,1 g Ba-Salz wurde die Säure mit der berechneten Menge verdünnter Schwefelsäure in Freiheit gesetzt; dann wurde das Filtrat (etwa 100 ccm) mit n H_2SO_4 auf 250 ccm aufgefüllt und am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt.

Kolorimetrische Bestimmung der abgespaltenen Phosphorsäure.

Zeit in Stunden	P_2O_5 mg	Abgesp. P_2O_5 in % des Gesamt-P_2O_5
3	269	29,3
5	312	34,0
10	413	45,1

Die Hydrolyse wurde abgebrochen, da die Lösung sich dunkel gefärbt hatte. Der durch Alkoholextraktion gewonnene Zucker wurde in 25 ccm wässeriger Lösung untersucht.

Reduktion nach *Bertrand*:

Aus 2,5 ccm 35,7 mg Cu, entsprechend 17,8 mg Glucose.

Reduktion nach *Auerbach-Bodländer*:

2,5 ccm verbrauchen 1,90 ccm n/10 J, entsprechend 17,1 mg Glucose.

Die Lösung ist also 0,72 % ig und enthält insgesamt nur 0,18 g Hexose

$$[a]_D = +\ 12,5^0,$$
$$(a = +\ 0,09^0,\ l = 1,\ c = 0,72.)$$

Bei der Vergärung machten sich im Vergleich mit Glucose und Fructose keine wesentlichen Unterschiede geltend.

Autorenverzeichnis.

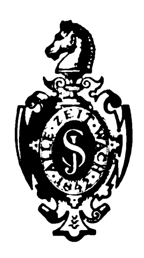
Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundachtzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1927

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig

Inhalt.

Notiz über die physiologische Indifferenz des Capsanthins.

Von

B. v. Issekutz und L. Zechmeister.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Szeged und dem chemischen Institut der Universität Pécs, Ungarn.)

(Eingegangen am 22. März 1927.)

Im Verlaufe von Untersuchungen über das bisher unaufgeklärte *Pigment von Fructi Capsici ann. L.* (Paprika) hat der eine von uns, gemeinsam mit Herrn *L. v. Cholnoky*, gezeigt, daß das „Capsicumrot" chemisch nicht einheitlich ist. Es ließ sich daraus, durch alkalische Hydrolyse der fettigen Extraktstoffe, der Hauptfarbstoff *Capsanthin* in kristallisierter Form isolieren[1]). 1 kg Fruchthaut enthält gegen 4 g des Farbstoffs, wovon etwa die Hälfte gefaßt worden ist. Die öfters geäußerte Ansicht[2]), daß die reifen Paprikaschoten durch Carotin gefärbt seien, ist hinfällig geworden. Capsanthin gehört nämlich nicht zu den Carotinoiden im engeren Sinne. Es ist um sechs Kohlenstoffatome ärmer und besitzt die Formel $C_{34}H_{48}O_3$, weist aber gemeinsame Züge mit den Carotinen auf.

Im Hinblick auf den relativ hohen Farbstoffgehalt der Droge, schien es von Interesse, orientierende Versuche über das Verhalten des Capsanthins im Tierkörper zu machen. Sie ergaben das Bild einer *vollkommenen Indifferenz*, was vor allem auf die Schwerlöslichkeit zurückzuführen sein wird. Dies Verhalten erinnert gleichfalls an Carotin, das nach den vorliegenden Angaben nicht oder schwer durch den Organismus verändert wird. Es kann nach Rübenfütterung in allen tierischen Fetten auftreten[3]), ist auch im Milchfett nachgewiesen[4]) und aus dem Corpus luteum der Kuh[5]), sowie aus Rindergallensteinen[6]) isoliert worden.

---

[1]) *L. Zechmeister* und *L. v. Cholnoky*, Ann. d. Chem. **454**, 1927.

[2]) *F. G. Kohl*, Untersuchungen über das Carotin und seine physiologische Bedeutung in der Pflanze, S. 42. Leipzig 1902.

[3]) *A. H. Gill*, Journ. Ind. and Engin. Chem. **9**, 136, 1917.

[4]) Vgl. z. B. *L. S. Palmer* und *L. H. Cooledge*, Journ. of biol. Chem. **17**, 251, 1914.

[5]) *H. H. Escher*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **88**, 198, 1913.

[6]) *H. Fischer* und *H. Röse*, ebendaselbst **88**, 331, 1914.

Versuche mit Capsanthin.

(In Emulsion: 16 mg Farbstoff, 0,2 g Gummi arab., 6 ccm Ringerlösung.)

a) Vier Mäuse (16 bis 22 g) erhielten 1 bis 5 mg subkutan. Keine Wirkung, Tiere nach 8 Tagen am Leben.

b) Am isolierten Froschherz waren 3 mg innerhalb 15 bis 20 Minuten unwirksam.

c) Zwei Frösche (32 und 40 g) erhielten je 4 mg subkutan in die Bauchgegend. Keine Symptome. Nach 48 Stunden getötet. Unter der Haut einheitliche rote Lage von unverändertem Farbstoff, der weder an der Haut noch an der Bauchwand haftet. Entzündungserscheinungen fehlen.

d) Isolierter Kaninchendarm. Erst 0,4 mg, dann steigende Dosen bis zu 4,0 mg. Weder Tonussteigerung noch Erschlaffung, noch Änderung des Rhythmus. Die Wirkung von Pilocarpin wurde von 6 mg Capsanthin nicht aufgehoben.

e) Drei Mäuse erhielten 1, 2, 5 mg per os. Wirkungslos innerhalb eines Tages.

f) Drei Mäuse erhielten 1, 2, 5 mg in öliger Lösung per os. Wirkungslos.

Für materielle Unterstützung danken wir dem Ungar. Naturwissenschaftlichen Landesfonds.

Beitrag zur Biochemie der Menstruation.

Von

Karel Klaus.

(Aus der ersten Frauenklinik und aus dem Institut für medizinische Chemie der Karls-Universität in Prag.)

(Eingegangen am 4. März 1927.)

Nachdem die erste Frage, ob und wieviel Cholin im Organismus der Frau während der Menstruation vorhanden ist, gelöst wurde[1], tauchte selbstverständlich die zweite Frage auf, wohin nämlich die verhältnismäßig großen Mengen von Cholin, welche im Blutkreislauf der Menstruierenden anwesend sind, verschwinden. Werden sie vom Organismus auf irgendwelche Weise zum Aufbau höherer körpereigenen Substanzen benutzt, oder werden sie aus dem Organismus aussgeschieden und dann wie und auf welchem Wege? Eben diese Frage, wie wird nämlich das Cholin vom Organismus ausgenutzt oder wie der Organismus des Giftes los wird, gehört zu den schwierigsten und bis jetzt sehr dunklen Fragen der Biochemie und Biologie, nicht nur des Cholins allein, sondern der gesamten biogenen Amine. Es ist eine auffallende und schon den ersten Untersuchern auf diesem Gebiete bekannte Tatsache, daß das einverleibte Cholin sehr rasch aus dem Kreislauf verschwindet. Das Tier geht im Experiment entweder sehr rasch zugrunde oder es erholt sich schnell vollständig.

Guggenheim und *Löffler* berichten, daß das subkutan oder intravenös einverleibte Cholin, obwohl es sehr rasch aus dem Kreislauf verschwindet, doch in sehr geringer Menge oder überhaupt nicht im Harn ausgeschieden wird. *Ellinger*, der diese Tatsache bestätigen konnte, wurde eben dadurch zu der Erklärung geführt, daß der Organismus fast die Hälfte des gesamten Cholins in der Haut deponiert. Dieser Gedanke hat sicherlich sehr viel für sich und läßt sich gut in Einklang bringen mit unseren Befunden, welche die intensive Ausscheidung des Cholins durch die Schweißdrüsen entdeckten. Dadurch schien uns die Frage, wohin das Cholin verschwindet, nur teilweise gelöst. Selbstverständlich ist es sehr zweifelhaft, ob dieser

[1]) „Zur Frage des Menotoxins", diese Zeitschr. **163**, H. 1/3, 1925.

Vorgang der einzige ist, wodurch sich der Organismus des Giftes entledigt, oder ob er noch andere Wege zur Verfügung hat. Wie wir in der Literatur konstatieren können, sind die Befunde über die Ausscheidung des Cholins im Harn sehr unsicher, und das Cholin wurde im Harn nur in geringen Spuren nachgewiesen. In der Literatur existieren zwar mehrere Angaben über das Vorkommen von dem Cholin verwandten Substanzen im menschlichen Harn. So konnte *Kutscher* aus dem Frauenharn eine Base isolieren, welcher angeblich eine Konstitutionsformel $C_7H_{17}NO_3$ gehört und welcher der Name Reduktonovain gegeben wurde. Ihr Entstehungsmechanismus und ihre Beziehung zum Cholin sind aber vollständig unbekannt. Nur das ist festgestellt worden, daß das Reduktonovain, mit Baryt destilliert, Trimethylamin abspaltet. Daher kann man annehmen, daß den Nieren bzw. dem uropötischen Apparat keine besondere Aufgabe bei der Cholinausscheidung zukommt.

Lassen wir also die bis jetzt nicht bewiesene Tatsache beiseite, daß der Organismus das Cholin zum Aufbau körpereigener Lecithine benutzt, so bleibt uns bei der Frau noch eine Möglichkeit übrig, und zwar die Ausscheidung des Cholins auf dem vaginalen Wege. Diese Möglichkeit schien uns um so mehr wahrscheinlich, als wir erkannt haben, daß unmittelbar vor der Menstruation das Cholinniveau im Organismus der Frau intensiv erhöht wird. Es wäre dann sehr leicht die Möglichkeit gegeben, daß das Cholin gleichzeitig mit dem Menstrualblute zur Ausscheidung gelangt. Vom biologischen bzw. physiologischen Standpunkte aus scheint dieser Ausscheidungsmechanismus durchaus möglich und natürlich. Aus diesem Grunde richteten wir unsere Aufmerksamkeit in erster Linie auf diese Ausscheidungsweise. Wir haben festzustellen versucht, ob das Menstrualblut tatsächlich freies Cholin enthält.

Zu diesem Zwecke haben wir eine ähnliche Methode gewählt wie die, welche sich uns bei dem Isolieren des Cholins im Schweiße bewährt hat. Das Menstrualblut von den gesunden, normal menstruierenden Frauen wurde in Mulltupfer aufgefangen; diese Mulltupfer wurden mit einer ähnlichen Binde, wie sie die Frauen bei der Menstruation zu tragen pflegen, dicht im Scheideneingang, welcher vorher gründlich gereinigt wurde, befestigt. Das Blut wurde nur am ersten Tage der Menstruation gesammelt, nachdem wir festgestellt haben, daß es sich bei der Frau um eine prämenstruelle Cholinämie handelt. Danach ließ sich erwarten, daß das größte Quantum von Cholin mit dem ersten Blute ausgestoßen wird. Die mit dem Blute vollgesogenen Tupfer wurden sofort in absoluten Alkohol gegeben, um jede bakterielle oder fermentative Zersetzung des Blutes zu verhindern. Der Alkohol, in welchem die Tupfer aufbewahrt wurden, wurde immer mit Salzsäure so angesäuert, daß er ständig eine saure Reaktion hatte. Der Alkohol wurde nach einem Tage abgegossen und filtriert. Das Filtrat wurde dann im Vakuum bei einer 40^0 C nicht übersteigenden Temperatur

eingedampft, der Rückstand in destilliertem Wasser aufgenommen und in dem Scheidetrichter mit Äther durchgeschüttelt. Der Äther, in welchen Fette und Blutfarbstoffderivate übergingen, wurde abgezogen, der wässerige Rückstand bis zur Trockne abgedampft, in Alkohol aufgenommen und filtriert. Dadurch wurde die Trennung vom Ammoniumchlorid durchgeführt. Das alkoholische Filtrat wurde wieder im Vakuum etwa auf 20 ccm eingeengt, mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert, mit Platinchloridlösung versetzt und im Vakuum über Schwefelsäure der Kristallisation überlassen. Nach 2 Tagen blieb auf dem Boden der Kristallisationsschale eine kristallinische Masse, welche mehrmals mit Äther durchgewaschen, gut getrocknet und analysiert wurde.

Die Analyse ergab aber Zahlen von Platin und von Stickstoff, welche keinem der bekannten komplexen Salze des Platinchlorids entsprachen. Trotzdem über 1000 Mulltupfer verarbeitet und die Analyse mehrmals durchgeführt wurde, sind wir zu keinem eindeutigen Resultat gekommen. Es wurde klar, daß kein einheitlicher Stoff vorliegt, und daß es sich eher um ein Basengemisch handelt, welches voneinander zu trennen schwierig, ja mit angewandter Methode unmöglich ist. Danach konnte man annehmen, daß das Cholin im unversehrten Zustande im *menstrualen* Blute nicht vorkommt, und daß das Cholinmolekül auf dem Wege durch Uterus und hauptsächlich durch die Vagina eine Änderung erfährt, höchstwahrscheinlich abgebaut wird. Zu dieser Annahme glaubten wir berechtigt zu sein auch durch den einzigartigen Geruch des Materials, welcher dem typischen Geruch des Trimethylamins ähnlich war. Es stellte sich daher heraus, daß wir von dem Isolieren des reinen Cholins nichts mehr erwarten können, und daß wir vielmehr nach den Abbauprodukten des Cholins fahnden müssen.

Wie schon oben gesagt wurde, ließ der eigentümliche Geruch des Menstrualblutes auf das Vorhandensein des Trimethylamins schließen. Um seine Anwesenheit im Menstrualblute zu beweisen, haben wir nach mehreren mißlungenen Versuchen, über welche hier der Kürze wegen nicht berichtet wird, folgende Methode gewählt.

Das Blut wurde, wie schon oben beschrieben, in die Mulltupfer aufgefangen. Diese Tupfer wurden dann in saurem Alkohol aufbewahrt. Der Alkohol wurde nach 1 Tage abgegossen, filtriert und auf dem Wasserbad im Vakuum bei niedriger Temperatur vorsichtig abgedampft. Der Rückstand wurde in destilliertem Wasser gelöst und in dem Scheidetrichter mehrmals mit Äther durchgeschüttelt. Die wässerige Lösung wurde abgezogen und filtriert. Zu diesem Filtrat wurde so viel Kalilauge gegeben, bis eine deutliche alkalische Reaktion auftrat. Danach wurde sofort in die Salzsäure destilliert, das Destillat vorsichtig

auf dem Wasserbad abgedampft und mit Alkohol extrahiert. Durch die alkoholische Extraktion wurde das Ammoniumchlorid größtenteils abgetrennt. Die alkoholische Fraktion wurde dann weiter nach der Methode von *Bertheaume* verarbeitet. Diese Methode beruht auf der verschiedenen Löslichkeit der Aminochloride in Chloroform. Während Ammoniumchlorhydrat und Methylaminchlorhydrat in Chloroform unlöslich sind, werden das Dimethylaminchlorhydrat und Trimethylaminchlorhydrat in Chloroform gelöst. So kann man die ersten zwei Basen von den letzten trennen. Also die alkoholische Lösung wurde bis zur Trockne abgedampft und der Rückstand mit Chloroform extrahiert. In die Chloroformlösung gehen die eventuell vorhandenen Dimethylaminchlorhydrate und Trimethylaminchlorhydrate über, während die noch vorhandenen Reste von Ammoniumchlorhydrat und Monomethylaminchlorhydrat ungelöst zurückbleiben. Bei der weiteren Trennung des Dimethylaminchlorhydrats vom Trimethylaminchlorhydrat wurde nach der Methode von *Délépine* vorgegangen. Die Chloroformlösung dieser zwei Basen bzw. ihrer Chloride wurde auf dem Wasserbade bis zur Trockne abgedampft, dann in 40proz. Formaldehydlösung gelöst und mit dem gleichen Volumen Kalilauge versetzt. Das eventuell vorhandene Dimethylamin reagiert mit dem Formaldehyd und bildet Tetramethylmethylendiamin und Dimethylaminoäthanol, während Trimethylamin unverändert bleibt und sich abdestillieren läßt. Bei der Destillation im Vakuum haben wir dann das Trimethylamin in Salzsäure aufgefangen und so wieder die Base in ihr Chlorhydrat übergeführt. Die Lösung wurde dann vorsichtig auf dem Wasserbad abgedampft. Auf dem Boden der Schale sind schneeweiße nadelförmige Kristalle geblieben, welche den Chlorid der zu identifizierenden Base darstellten. Die Kristalle wurden mehrmals in Alkohol gelöst, die Lösung mehrmals abgedampft und filtriert und so das ganze Material der Reinigung unterzogen. Auf diese Weise gereinigte Kristalle wurden in die alkoholwässerige Lösung aufgenommen, diese Lösung mit ein paar Tropfen Salzsäure angesäuert und mit Platinchloridlösung versetzt, das Ganze im Exsikkator über Schwefelsäure der Kristallisation überlassen. Nach einigen Tagen schieden sich auf dem Boden der Kristallisationsschale orangerote kleine Tafeln ab, welche manchmal hexagonal angeordnet waren; in Äther unlöslich, werden sie in Alkohol und Wasser gelöst. Bei der Analyse des Präparats gefunden:

	Gefunden Proz.	Theorie Proz.
Platin	36,75	36,90

Zur theoretischen Berechnung wurde das Trimethylaminchlorid $[N(CH_3)_3 \cdot HCl]_2 PtCl_4$, Molekulargewicht 528,136, genommen.

Die Analyse bestätigte, daß tatsächlich Trimethylamin vorliegt. Unsere Annahme, daß das Cholin auf dem Wege durch Uteruskavum und durch die Scheide abgebaut wird, wurde bestätigt.

Mit den Methoden, welche uns bis jetzt zur Verfügung stehen, können wir nur einen qualitativen Nachweis des Trimethylamins durchführen. Irgend ein Schluß auf die quantitativen Verhältnisse ist durchaus unmöglich. Eine Vorstellung über die quantitativen Verhältnisse des Trimethylamins und anderer Basen im Menstrualblut können wir uns nur sehr schwer machen. Es ist sicher, daß das Trimethylamin auch außerhalb der Menstruation in der menschlichen Vagina vorhanden ist. Aber seine Menge scheint doch unbeträchtlich zu sein, worauf die saure Reaktion des vaginalen Sekrets hinweist. Erst mit der Menstruation tritt die alkalische Reaktion mehr zutage und ist sicher auf die Anwesenheit dieser Basen, welche gleichzeitig mit dem Blute in die Vagina gelangen, zurückzuführen. Diese alkalische Reaktion wurde auch für die Erklärung der protrahierten Gerinnung des Menstrualbluts zugezogen. Daraus kann man schließen, daß das Quantum von Trimethylamin, welches aus der Vagina stammt, sehr gering ist, und daß fast das ganze Quantum des isolierten Trimethylamins und anderer Basen aus dem Cholin, welches im Menstrualblut vorhanden ist, entsteht. Der Entstehungsmechanismus läßt sich am besten durch die Tätigkeit der bakteriellen Vaginalflora erklären, welche imstande ist, das Cholin unter Abspaltung von Trimethylamin zu zerlegen.

Dieser Vorgang ist nicht nur theoretisch sehr gut möglich, sondern wird auch durch zahlreiche Erfahrungen, welche auch experimentell bewiesen sind, unterstützt. Lassen wir die Möglichkeit beiseite, daß das Cholin zum Aufbau höherer Substanzen, körpereigener Lecithine verwendet wird, so bleibt uns die Möglichkeit des Cholinabbaues übrig.

Dieser Vorgang beruht entweder auf den oxydativen Prozessen, durch welche eine Reihe von verschiedenen Abbauprodukten gebildet wird (*Betain*), oder wird das Cholinmolekül durch Hydratation gespalten unter Entstehung von Trimethylamin und Glykolsäure, welche entweder synthetisch verbraucht wird oder als Glyoxylsäure bzw. Oxalsäure ausgeschieden wird (*Guggenheim*). *Hösslin*, welcher den Versuchstieren das Cholin per os oder subkutan verabreichte, konnte in ihrem Harn eine erhebliche Zunahme der Ameisensäure feststellen. Danach möchte man an die Entmethylierung des Cholins schließen. Wie weit dieser Vorgang geht, ob eine vollständige Demethylation stattfindet oder nur partiell vor sich geht, ist bis jetzt noch unentschieden. Nach *Riesser* kommt im Organismus nur die partielle Entmethylierung zustande. Dann sind es die Mikroorganismen, welche das Cholin zu verändern bzw. zu spalten vermögen. *Ackermann* und *Schütze* gelang es nachzuweisen, daß bei Züchtung des Bacillus prodigiosus auf dem cholinhaltigen Nährboden aus dem Cholin Trimethylamin und Methylamin abgespaltet wird. Nach *Emmerling* entsteht Trimethylamin durch Zerlegung des Fibrins durch Streptococcus longus, bei Züchtung des Proteus

vulgaris auf Fleisch usw. Es seien hier nur diese Tatsachen aufgeführt als Stütze für die Annahme, daß das Cholin, welches im Blute der Menstruierenden vorhanden ist, auf dem Wege durch Uterus und durch die Vagina leicht zerlegt werden kann. Die isolierten Spaltungsprodukte können also tatsächlich Cholin als ihre Muttersubstanz haben. Und das um so mehr, als erwiesen ist, daß die Entstehung des Trimethylamins im Tierkörper fast ausschließlich auf die Zerlegung des Cholins zurückzuführen ist.

Auf Grund dieser Untersuchungen können wir folgende Theorie aufstellen: Was geschieht zuerst mit dem Cholin, welches durch die Schweißdrüsen der Haut vor und während der Menstruation ausgeschieden wird? Es ist zweifellos, daß die verhältnismäßig große Menge von Cholin, welche die Schweißdrüsen liefern, durch die Tätigkeit der Hautbakterien zerlegt wird unter der Abspaltung des Trimethylamins, welches als flüchtiges Gas sofort von der Hautoberfläche verschwindet. Es läßt sich daher die Vermutung aussprechen, daß hauptsächlich das Trimethylamin neben anderen flüchtigen Substanzen dem Menstruationsschweiß seinen eigenartigen Geruch verleiht. Nervus olfactorius empfindet noch $^1/_{500}$ mg des Trimethylamins. Dieser Geruch wird besonders bei den Frauen, welche ihrer körperlichen Toilette keine besondere Aufmerksamkeit widmen, sofort auffallend und lästig empfunden. Es ist natürlich heute schwer zu entscheiden, ob dieser eigenartigen Erscheinung in den primitiven Urzeiten eine teleologische Bedeutung zukam. Die Funktion des Geruchssinns als Vermittler der erogenen Impulsen ist beim Menschen erloschen, und es ist sehr unsicher, ob sie je bestanden hat. Nur in der menschlichen Sexualpathologie spielt sie eine gewisse Rolle. Aber es ist eine gut bekannte Tatsache, daß der Geruchssinn im Sexualleben der Tiere eine wichtige Bedeutung besitzt. Das Tier wird hauptsächlich durch seinen Geruchssinn erotisiert. Es ist wiederholt berichtet worden, daß die menstruierende Frau von verschiedenen Tieren angegriffen wurde, welche durch den spezifischen Geruch der Menstruationsexkrete in sexuelle Erregung gebracht wurden. Es läßt sich also die Vermutung aussprechen, daß es eben das Trimethylamin ist, welches mit dieser Erscheinung in Zusammenhang gebracht werden kann. Über das Schicksal des Cholins in der Vagina wurde schon gesprochen. Es sei noch folgende Frage kurz erwähnt. Ist das Trimethylamin das Endprodukt der Cholinspaltung oder findet in der Vagina eine weitere Entmethylierung des Cholins statt? Bei den ersten Analysen haben wir wiederholt höhere Zahlen von Platin bekommen (42,8, 41,4 Proz.), trotzdem sämtliches Ammoniumchlorid sorgfältig entfernt wurde. Später konnten wir mehrmals feststellen, daß in der ersten (chloroformunlöslichen) Fraktion nach der Trennung von Ammoniumchlorid immer eine weiße kristallinische Masse zurückblieb, welche in Chloroform und Äther unlöslich, in Alkohol und Wasser

leicht löslich war. Mit Platinchlorid gab sie Verbindung, welche wegen sehr geringer Menge nicht analysiert werden konnte. Aber die physikalischen Eigenschaften (Löslichkeit) und dann die höheren Zahlen von Platin in den ersten Analysen gestatten, an die Anwesenheit von Methylaminchlorid zu denken. Danach möchte man an eine Entmethylierung des Cholins in der menschlichen Vagina vom Trimethylamin bis zum Monomethylamin schließen.

Zu Ende sei hier noch der Arbeiten von *P. Zweifel* gedacht, welche in den Jahren 1877 bis 1881 publiziert wurden. *P. Zweifel* hat damals versucht, eine sonderbare Form der Scheidenerkrankung, sog. Vaginitis emphysematosa oder Kolpohyperplasia cystica (*Winckel*), durch die Anwesenheit von Trimethylamin in den Scheidenbläschen zu erklären. Trotzdem *Zweifel* die Anwesenheit des Trimethylamins in der Scheide einwandfrei feststellen konnte, stieß damals seine Erklärung auf heftigen Widerstand und führte zu den Polemiken mit *Eppinger*, *Klausner*, *Welponer* und *Lebedeff*. Seitdem sind schon 50 Jahre verflossen und die Ätiologie dieser sonderbaren Erkrankung ist immer noch nicht vollständig geklärt. Meiner persönlichen Meinung nach liegt die wichtigste Rolle des Cholins und seiner Derivate auf anderem Gebiet, nämlich in dem biochemischen Mechanismus, welcher zur protrahierten Gerinnung des Menstrualblutes führt. Die wichtige Rolle der Phosphatide bei der Gerinnung des Blutes ist dank den neueren Untersuchungen gut bekannt. Ob das auch für ihre Abbauprodukte zutrifft, muß den weiteren Untersuchungen vorbehalten werden.

Aber auch vom anderen Standpunkte gewinnt das Vorhandensein dieser Stoffe im Menstrualblut eine praktische Bedeutung. Die pharmakologischen und toxikologischen Erfahrungen, welche durch die Experimente an den Tieren und auch am Menschen gemacht wurden, haben erwiesen, daß es sich um ausgesprochen giftige Stoffe handelt. Sämtliche primäre, sekundäre und tertiäre Alkylamine besitzen, wie die Ammoniumsalze, eine zentrale Wirkung, welche sich in narkotischen und Lähmungserscheinungen äußert. In größeren Dosen tritt auch periphere, curareartige Wirkung auf. Trimethylaminchlorhydrat in größeren Dosen bewirkt beim Hunde eine Verlangsamung des Pulses und Temperatursenkung (*Guggenheim*). *Abelouse* und *Bardier* führen an, daß die Wirkung des Trimethylamins auf die Speichelsekretion, Respiration und den Blutdruck qualitativ dieselbe ist, wie die Wirkung einer unbekannten Harnbase namens Urohypertensin. (Reduktonovain ? *Kutscher*.) *Formánek*, welcher die toxischen Eigenschaften des Mono-, Di- und Trimethylaminchlorhydrats und die Wirkung der Ammoniumsalze ausführlich studiert und beschrieben hat, berichtet, daß mit Zunahme der Methylierung die initiale Drucksteigerung, die durch Kontraktion der auch außerhalb des Splanchnikusgebiets liegenden Gefäße bewirkt wird, zunimmt. Mit Zunahme der Methylierung wird die Wirkung auf das Herz schwächer. Die Reizung des vasokonstriktorischen Nervenapparats ist bei den Methylaminen zentral und peripher, beim Trimethylamin ausschließlich peripher, wogegen Ammoniumsalze hauptsächlich zentral wirken. Die zentrale Erregung des Herzvagus wird mit der Zunahme der Methylierung geringer und seltener. Im allgemeinen kann man sagen, daß die Giftigkeit der Methylamine mit der Zunahme der Methylierung abnimmt, so daß sie bei den Ammoniumsalzen am größten, bei Trimethylamin am schwächsten ist.

Es seien nur diese Tatsachen aufgeführt als Beweis für die Toxizität aller dieser Stoffe. In der letzten Zeit erscheinen in der gynäkologischen Literatur Arbeiten, welche versuchen, die verschiedensten Komplikationen und Erkrankungen, welche sehr oft nach den gynäkologischen Operationen auftreten, nicht durch Ausfall der Ovarialtätigkeit, sondern durch Ausfall der Menstruation zu erklären. *Aschner* ist der erste Vorkämpfer dieser Richtung und macht auf diese Tatsache aufmerksam. Er faßt, durch Erfahrungen mit großem Material belehrt, diese Erkrankungen als Retentionstoxikosen auf. Die Menstruation ist für den Gesamtstoffwechsel der Frau ein sehr wichtiger Vorgang, der weibliche Organismus ist höchstwahrscheinlich auf diesen Vorgang eingestellt, so daß, wenn die Menstruation unmöglich wird, im weiblichen Organismus gewisse Störungen auftreten. Es liegt der Gedanke nahe, diese Störungen tatsächlich durch die Retention der giftigen Stoffe im weiblichen Körper zu erklären. *Aschner* sagt noch im Jahre 1924, daß es bis jetzt mit unseren physikalischen und chemischen Untersuchungsmethoden nicht gelungen ist, ein Menstrualgift nachzuweisen; wir glauben sagen zu können, daß durch diese Arbeit solche Stoffe im Menstrualblut nachgewiesen wurden, welche gestatten, von einer „Giftigkeit“ des Menstrualblutes zu sprechen. Ob diese Stoffe, wenn sie retiniert bleiben, tatsächlich die bekannten Störungen im weiblichen Organismus verursachen können, läßt sich selbstverständlich vorläufig nicht sagen. Weitere Versuche und Beobachtungen können uns der Lösung dieser Frage näher bringen.

Literatur.

1) *M. Guggenheim*, Die biogenen Amine. Berlin 1920. — 2) *Aschner*, Die Blutdrüsenerkrankungen des Weibes. Wiesbaden 1918. — 3) *Derselbe*, Die Konstitution der Frau. München 1924. — 4) *Derselbe*, Arch. f. Gynäkologie **124**, 1925. — 5) *E. Formánek*, Archives Internationales de Pharmacodynamie et de therapie, **7**, 3, 4, 5, 6; **9**, 5 und 6. — 6) *K. Klaus*, diese Zeitschr. **163**, H. 1/3, 1925.

Bemerkung zu der Arbeit von Ludwig Jost: Über Potentialdifferenzen am Apfel[1]).

Von

L. Michaelis.

(Johns Hopkins University, Laboratories of Research Medicine, Baltimore).

(Eingegangen am 15. März 1927.)

In der in der Überschrift genannten Arbeit zitiert *Jost* einen Satz aus der Arbeit von *Fujita*[2]): „Wir messen somit den Potentialunterschied des Apfelsaftes gegen die äußere Elektrolytlösung in der Petrischale", und weist nach, daß diese Behauptung nicht völlig zutrifft. Hiermit hat *Jost* zweifellos recht, aber der Einwand bezieht sich auf eine Behauptung, die aus dem Satze infolge einer Ungenauigkeit der Ausdrucksweise zwar herausgelesen werden kann, aber nicht so gemeint war. Da dieses Mißverständnis die weitere Diskussion des Themas erschweren kann, möchte ich die Sache aufklären. Statt „des Apfelsaftes" sollte es heißen: „der Apfelschale". Denn nur diese, nicht aber der Apfelsaft, wird von der Elektrolytlösung in der Petrischale berührt.

In der Arbeit von *Fujita* wird nämlich nirgends der Versuch gemacht, die gesamte elektromotorische Kraft der mit Hilfe des Apfels hergestellten Ketten aufzuklären. Vielmehr handelt es sich um folgendes: Wenn man in zwei Versuchen, die kurz hintereinander mit demselben Apfel angesetzt werden, alles konstant hält mit Ausnahme der Lösung, welche die intakte Schale berührt, so mißt man die Potentialdifferenz zwischen der Schale und dieser Außenlösung *bis auf eine additive Konstante,* welche unbekannt bleibt. Diese additive Konstante ist individuell für den betreffenden Apfel, sie ist auch abhängig von den Einzelheiten der Versuchsanordnung, z. B. ob die zweite Ableitungsstelle eine intakte oder eine verletzte Stelle des Apfels ist, auch sicherlich

1) Diese Zeitschr. **179**, 400, 1927.
2) Ebendaselbst **158**, 11, 1925.

davon, ob der Apfel lebend ist oder durch eine eindringende Schädlichkeit (z. B. Siedehitze) abgetötet worden ist, und dergleichen. An der gesamten EK sind sicherlich auch Potentialdifferenzen beteiligt, die irgendwo im Innern des Apfels an Zellmembranen entstehen.

Fujita hat gezeigt, in welcher Weise der Potentialunterschied der *äußeren Schale* und einer Elektrolytlösung von der Zusammensetzung der letzteren abhängt, aber er hat nicht die Frage aufgeworfen oder zu beantworten gesucht, ob neben dieser Kutikula noch eine oder mehrere andere Stellen mit irgendwelchen Potentialsprüngen vorkommen. In Zusammenhang damit steht auch, daß er die Frage des Verletzungsstromes nicht berührt. Schon *Beutner*[1]) hat ganz scharf unterschieden zwischen dem Konzentrationseffekt, den die Kutikula hervorruft, und der unabhängig davon ist, ob man mit einem intakten Apfel oder mit der Kutikula allein arbeitet — und dem Verletzungseffekt. *Fujita* behandelt nur den Konzentrationseffekt *an der Kutikula*. Er hat auch gezeigt, daß die Behandlung der Außenschale mit Giften nur sehr wenig an dem Konzentrationseffekt an der Kutikula ändert, und insofern darf er mit Recht behaupten, daß der Konzentrationseffekt an der Kutikula nichts mit dem Leben von Zellen zu tun hat.

Die Befunde von *Jost* sind auf alle Fälle sehr lehrreich, aber sie stellen keinen Gegensatz zu den Versuchen von *Fujita* dar. Sie zeigen nur um so deutlicher, daß die Potentialdifferenzen, welche an lebenden Plasmamembranen entstehen, recht analog denen sind, die an der Wachskutikula entstehen. Und das war ja gerade der, wenn auch vorläufig nicht mit aller Schärfe hervorgehobene Sinn der Untersuchung von *Fujita*: zu zeigen, daß die Plasmamembran einer lebenden Zelle mit der Wachskutikula verglichen werden kann, abgesehen von der Dicke und der dadurch bedingten erhöhten Resistenz gegen strukturzerstörende Einflüsse.

Im übrigen soll hiermit nicht behauptet werden, daß die elektrischen Erscheinungen selbst an der zellfreien Kutikula hiermit völlig aufgeklärt seien. Eine genauere Stellungnahme zu dieser Frage, insbesondere auch zu der von *Beutner* gegebenen Deutung, soll für eine spätere Zeit verschoben werden. Ich hielt es für zweckmäßiger, zunächst die elektrischen Erscheinungen an einfachen Membranen weiter aufzuklären, in der Hoffnung, daß eine Nutzanwendung auf physiologische Membranen sich dann von selbst ergeben würde. Aus diesem Grunde wurde in den weiteren Untersuchungen, die in den späteren Mitteilungen

[1]) *R. Beutner*, Die Entstehung elektrischer Ströme in lebenden Geweben, S. 134ff. Stuttgart 1920.



meiner Serie in dieser Zeitschrift beschrieben sind, von physiologischen Objekten zunächst abgesehen. Vielleicht wird sich dieser Umweg lohnen, da jahrzehntelange Bemühungen, direkt den physiologischen Objekten auf den Leib zu gehen, wenig Erfolg hatten, solange wir nicht mit Modellen vertraut genug waren. Die zellfreie Wachskutikula des Apfels ist *ein* solches Modell, welches noch dazu den Vorteil hat, in der Mitte zu stehen zwischen einem völlig unphysiologischen Modell wie einer Membran aus Kollodium oder Paraffin, und der Membran der lebenden Zelle, denn die Cuticula ist eine Membran, die von lebenden Zellen sezerniert worden ist und möglicherweise geradezu ein vergröbertes Ebenbild der eigentlichen Zellmembran darstellt.

Eine nephelometrische Methode zur Bestimmung kleiner Arsenmengen.

I. Mitteilung:

Ein neues Trübungsreagens und das Verhalten der mit dem Reagens hergestellten Arsensäuretrübungen.

Von

Hans Kleinmann und **Fritz Pangritz.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 22. März 1927.)

I. Einleitung.

Die bisher geübte Bestimmung kleiner Arsenmengen gründete sich im wesentlichen auf drei Prinzipien:

a) Bestimmungsformen, bei denen das Arsen metallisch

1. als Arsenspiegel,
2. als kolloidales Arsen abgeschieden wird;

b) Bestimmungsformen, bei denen Arsenlösungen titrimetrisch bestimmt werden;

c) Bestimmungsformen auf Grund kolorimetrischer Reaktionen.

Der Arsennachweis nach *James Marsh*[1]) in der von *J. Liebig*[2]) geschaffenen Modifikation: „die Zerlegung des entwickelten Arsenwasserstoffs durch Glühen in einer schwer schmelzbaren Glasröhre zur Abscheidung des Arsens" ist das älteste der heute üblichen Verfahren und bildet die Grundlage der zuverlässigsten und feinsten Mikro-Arsennachweismethoden. Es haben sich neben *W. Thomson*[3]) und *C. Pedersen*[4]) vor allem *G. Locke-*

---

[1]) *James Marsh*, Edinburgh New Philos. Journ. **21**, 229, 1836; Liebigs Ann. d. Pharm. **23**, 206, 1837.

[2]) *J. Liebig*, Ann. d. Pharm. **23**, 223, 1837.

[3]) *W. Thomson*, Nachweis und annähernde Bestimmung geringer Mengen von Arsen in Bier, Brauereimaterialien und Nahrungsmitteln. Chem. News. **86**, 179, 1902.

[4]) *C. Pedersen*, Nachweis und annähernde Bestimmung von Arsen in Bier. C. r. des travaux du Laboratoire de Carlsberg **5**, 108, 1903.



mann[1]) und *O. Billiter*[2]) darum bemüht, die Empfindlichkeit dieses Verfahrens zu steigern und ihm eine möglichst exakte Form zu geben. *Lockemann* gibt an, daß sich bei genauer Beobachtung aller von ihm gegebenen Vorsichtsmaßregeln mit Hilfe seines verbesserten *Marsh-Liebig*schen Apparats noch 0,0001 mg Arsen „nachweisen" lassen. Antimon, nach *Billiter*[2]) auch Quecksilber in der Untersuchungsflüssigkeit können aber den ganzen Nachweis nach diesem Verfahren illusorisch machen.

O. Billiter[2]) ist es sogar möglich gewesen, die „Empfindlichkeit" des *Marsh*schen Verfahrens auf 0,00001 mg = 0,01 μg As zu steigern. Was nun die quantitative Messung des Arsens in Form der abgeschiedenen Arsenspiegel anbetrifft, so verfährt *Lockemann* in der Weise, daß er sie mit den Spiegeln einer mit abgemessenen Arsenmengen (1, 3, 5, 7, 10 μg As) hergestellten Normalskala vergleicht. Diese Art der Bestimmung der gefundenen Arsenmenge ist unter allen Umständen trotz aller notwendigen Subtilität und recht beträchtlichen Schwierigkeit in der anzuwendenden Technik nur eine Schätzung und keinesfalls eine quantitative Messung und kann Abweichungen vom tatsächlichen Wert in Höhe von 100% und mehr bedingen. *O. Billiter*, der selbst jahrelang diese Vergleichsmessungen ausführte, verwirft sie später[3]), weil sie zu ungenaue Werte liefern, und bestimmt das Arsen jodometrisch: Der Arsenspiegel wird in einer bestimmten Menge Jod gelöst und das überschüssige Jod mit Thiosulfat zurücktitriert. Die Methodik in dieser Form soll eine Genauigkeit von 0,001 μg As erreichen und dabei genaue Werte liefern. Über diese Art der Bestimmung folgt noch Näheres bei Abhandlung der titrimetrischen Bestimmungsformen. Erwähnt sei noch ein elektrolytisches Verfahren zur Bestimmung kleiner Arsenmengen nach *G. W. Monier-Williams*[4]). Aber auch hier finden die unzulänglichen Vergleichsmessungen mit einer Normalskala Anwendung.

Dieselbe Betrachtung gilt für Methoden, die sich auf die Herstellung und Schätzung von Beschlägen stützen, wie die Methoden von *Reinsch*[5]), *J. B. Cowley* und *J. P. Catford*[6]) und von *E. Pribyl*[7]).

Den Bestimmungsformen, die das elementar abgeschiedene Arsen aus der Stärke von Spiegeln oder Beschlägen *schätzen*, steht eine Bestimmungsform gegenüber, die Abscheidungen von kolloidalem metallischen Arsen zu kolorimetrischen *Messungen* benutzt.

---

[1]) *G. Lockemann*, Über den Arsennachweis mit dem *Marsh*schen Apparat, Zeitschr. f. angew. Chem. **18**, 416, 1905; **18**, 423, 1905; Über die katalytische Zersetzung des Arsenwasserstoffs, ebendaselbst **18**, 491, 1905; Über den Nachweis kleiner Arsenmengen in Harn, Blut und anderen Substanzen, diese Zeitschr. **35**, 478, 1911.

[2]) *O. Billiter*, Helv. Chim. Acta **1**, 475 bis 498, 1918; vgl. auch **6**, 258 bis 259, 1923.

[3]) *Derselbe*, ebendaselbst **6**, 771 bis 779, 1923.

[4]) *G. W. Monier-Williams*, The Analyst **48**, 112 bis 114, 1923.

[5]) *H. Reinsch*, Journ. f. prakt. Chem. **24**, 244, 1841.

[6]) *J. B. Cowley* und *J. P. Catford*, Zur Bestimmung des Arsens. Pharm. Journ. (4) **19**, 897, 1904.

[7]) *E. Pribyl*, diese Zeitschr. **159**, 276 bis 279; Chem. Centralbl. **1925**, II, 1198.

Nach *L. Vallery*[1]) kann man das nach der Schneiderdestillation isolierte Arsen, das sich als As''' in Lösung befindet, durch unterphosphorige Säure in einem bestimmten Volumen quantitativ zu kolloidal sich ausscheidendem Arsen reduzieren und dann ein Quantum dieser Lösung gegen eine geeignete Vergleichslösung bekannten Arsengehalts im Kolorimeter messen. Nach *Vallery* ist diese Reduktion durch unterphosphorige Säure für Arsen spezifisch. Mit Hilfe des Kolorimeters ist es ihm möglich gewesen, Arsenmengen in der Größenordnung $2 . 10^{-4}$ bis $5 . 10^{-4}$ mg (also 0,0002 mg bis 0,0005 mg As) mit einem durchschnittlichen Fehler von 3% zu bestimmen.

Diese Methode hat den Nachteil, daß ihr Bestimmungsbereich ein außerordentlich enges, da es, wie gesagt, durch die Grenzen 0,0002 bis 0,0005 mg Arsen gegeben ist.

Weit exakter in der endgültigen Messung als die auf Schätzung von Spiegeln bzw. Beschlägen beruhenden Methoden sind diejenigen, die sich der titrimetrischen Bestimmung von Arsenlösungen bedienen.

Es lassen sich prinzipiell zwei Verfahren unterscheiden: das jodometrische und das Bromatverfahren. Beide Verfahren erfordern die totale Trennung des Arsens von allen Substanzen, die die oxymetrische Bestimmung der arsenigen Säure irgendwie stören könnten. Diese Trennung wird hauptsächlich nach der Schneiderdestillation oder einer ihrer Modifikationen durchgeführt.

Es seien die jodometrischen Verfahren von *A. Bruckl*[2]) und *I. Bang*[3]) genannt. *A. Bruckl* titriert mit einer n/500 Jodlösung und kann 0,02 mg As_2O_3 noch exakt bestimmen; *I. Bang* erreicht den gleichen Wert bei einer Titration mit n/200 Jodlösung. Das letztere Verfahren ist von *H. E. Cox*[4]) nachgeprüft und als nicht verläßlich befunden worden. Beide Verfahren gestatten überdies nur die quantitative Bestimmung von relativ größeren Arsenmengen. Das wird verständlich, wenn man sich vergegenwärtigt, daß 1 ccm n/100 Jodlösung — 0,375 mg As, 1 ccm n/500 Jodlösung erst 0,075 mg As entsprechen. Vielleicht gebührt dem Verfahren nach *O. Billiter*[5]) der Vorzug, der den nach *Marsh* abgeschiedenen Arsenspiegel in der vier- bis fünffachen Menge Jod zu As_2O_5 löst und das überschüssige Jod je nach der erwarteten Arsenmenge mit n/100 bis n/1000 Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert.

Das von *Ramberg-Sjöström*[6]) angegebene Bromat-Titrationsverfahren ist von *H. Engleson*[7]) und *H. E. Cox*[4]) nachgeprüft und für gut befunden worden.

---

[1]) *L. Vallery*, Über die Bestimmung des Arsens in Zinn und Verzinnungen. C. r. de l'Acad. des Sciences **169**, 1400—1402, ebenda **1412**, 1919.

[2]) *A. Bruckl*, Mikromaßanalytische Bestimmung von Arsen. Mikrochem. **1**, 54 bis 57, 1923.

[3]) *I. Bang*, Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Arsen. Diese Zeitschr. **161**, 193, 1925.

[4]) *H. E. Cox*, Über gewisse Verfahren zur Bestimmung kleiner Arsenmengen und über dessen Vorkommen in Harn und Fisch. The Analyst **50**, 3 bis 13.

[5]) *O. Billiter*, Helv. chim. Acta **6**, 771 bis 779, 1923; Neuchâtel. Univ.

[6]) *Ramberg-Sjöström*, Ber. der Schwedisch. Arsen-Kommiss. 1909.

[7]) *H. Engleson*, Über die Bestimmung kleinster Arsenmengen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **111**, 201—222, 1920.



Es gestattet nach *H. Englesons* Angaben, unter Einhaltung bestimmter von ihm gegebener Vorsichtsmaßregeln, arsenige Säure mit einer Genauigkeit von ± 0,002 mg zu titrieren.

Das dritte Prinzip zur Bestimmung von Arsen, neben der Herstellung von Arsenniederschlägen oder der Titration der verschiedenen Oxydationsstufen, ist die durch Reaktionen von Arsen oder seinen Verbindungen mit gewissen Substanzen erzielte Herstellung von Färbungen, die meßbar und damit zur Bestimmung geeignet sind.

Verfahren dieser Art sind von *Gutzeit*[1]), *A. Flückiger*[2]), *F. Hefti*[3]), *C. L. Sanger* und *O. F. Black*[4]), *C. Hollins*[5]), *I. M. Kolthoff*[6]), *I. A. Goode* und *F. M. Perkin*[7]), *Smith*[8]), *K. Beck* und *Merres*[9]), *H. Führer*[10]), *W. E. Lawson* und *W. A. Scott*[11]), *I. Cribier*[12]), *L. W. Winkler*[13]), *L. W. Andrews* und *H. V. Farr*[14]) u. a. teils neu ausgearbeitet, teils verbessert worden. Allgemein kann man von ihnen sagen, daß sie mehr qualitativen Charakter tragen und deshalb für eine analytisch exakte, quantitative Bestimmung kleiner Arsenmengen nicht in Frage kommen.

Einen neuen Weg beschritt *P. Chouchak*[15]), der mittels eines Molybdän-Chininreagens Trübungen mit fünfwertigen Arsenverbindungen herstellte, die er kolorimetrisch maß. Mit seinem Reagens, das eine hohe Empfindlichkeit dadurch erhielt, daß es bis zur Empfindlichkeitsgrenze mit As_2O_5 abgesättigt wurde, will Verfasser noch 0,00002 mg Arsen nachweisen können. „Zur kolorimetrischen *Bestimmung* des Arsens sind dagegen die Bedingungen am günstigsten, wenn Mengen zwischen 0,008 bis 0,035 mg in einem Volumen von 25 ccm vorliegen.“ Als Vergleichslösung benutzt *Chouchak* eine Arsenstandardlösung.

---

1) *Gutzeit*, Pharm. Ztg. **24**, 263, 1879.

2) *A. Flückiger*, Nachweis kleinster Mengen von Arsen. Arch. d. Pharm. **27**, 1, 1889.

3) *F. Hefti*. Inaug.-Diss. Zürich 1907.

4) *C. L. Sanger* und *O. F. Black*, Quantitative Bestimmung von Arsen nach *Gutzeit*. Journ. Soc. Chem. Ind. **26**, 1115, 1907.

5) *C. Hollins*, ebendaselbst **36**, 576 bis 577, 1917.

6) *I. M. Kolthoff*, Pharm. Weekblad **59**, 334.

7) *J. A. Goode* und *F. M. Perkin*, Bemerkungen über die *Gutzeit*sche Probe auf Arsen. Journ. Soc. Chem. Ind. **25**, 507, 1906.

8) *Smith*, United States Departement of Agriculture. Bureau of Chem. Circular Nr. 102, S. 5.

9) *K. Beck* und *Merres*, Über die Bestimmung kleiner Arsenmengen mit besonderer Berücksichtigung des Verfahrens von *Smith*. Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt **50**, 38, 1917.

10) *H. Führer*, Ein einfaches Verfahren zur Bestimmung kleinster Arsenmengen in Leichenteilen. Ber. d. Deutsch. Pharm. Ges. **28**, 221, 1918.

11) *W. E. Lawson* und *W. A. Scott*, Journ. of biol. Chem. **64**, 23 bis 28; Edgewood (Maryland).

12) *I. Cribier*, Über ein neues Verfahren der Arsenbestimmung. Journ. Pharm. et Chim. (7) **24**, 241 bis 246, 1921.

13) Vgl. *L. W. Winkler*, Über den Nachweis des Arsens mit *Bettendorf*schem Reagens. Zeitschr. f. angew. Chem. **26**, 143, 1913.

14) *L. W. Andrews* und *H. V. Farr*, Die volumetrische Bestimmung kleiner Arsenmengen. Zeitschr. f. anorg. Chem. **62**, 123, 1909.

15) *P. Chouchak*, Kolorimetrische Bestimmung des Arsens mit Chininmolybdat. Annales de chimie anal. appl. (2) **4**, 138—142, 1922.

Die Möglichkeit, mittels eines Reagenses hochempfindliche Trübungen durch Arsen zu erhalten, legte es nahe, zu versuchen, die von *Chouchak* beschriebene Trübung nicht kolorimetrisch, sondern exakter und empfindlicher mittels des Tyndallichtes, also nephelometrisch zu messen. Es wurden daher die Angaben *Chouchaks* und die Brauchbarkeit der Methodik genau nachgeprüft. Es konnten hierbei verschiedene Punkte nicht reproduziert werden. So war es erstens nicht möglich, nach den Angaben *Chouchaks* ein klar bleibendes Reagens herzustellen, zweitens beschränkte sich die Empfindlichkeit der Methodik auf Arsenmengen in der Größenordnung von etwa 10^{-5} g As in 25 ccm. Für die nephelometrische Messung konnte aber die *Chouchak*sche Methodik schon deshalb nicht in Anwendung kommen, weil durch die Opaleszenz der angewandten Chininlösungen eine deutliche Fluoreszenz der ungetrübten Reaktionslösung bedingt wurde.

Es läßt sich daher zusammenfassend sagen: Es ist nach den bestehenden Angaben der Literatur möglich, Arsenmengen bis zu 0,0002 mg (*Vallery*) zu messen. Diese empfindlichste Methode hat aber ein zu kleines Bestimmungsbereich. Die zweifellos am besten und exaktesten durchgeführten Methoden zur Bestimmung kleinster Arsenmengen (*Lockemann* und *Billiter*) gehen bis auf Größen von etwa 0,001 mg Arsen herunter. Diese Methoden sind aber trotz ihrer Präzision in der Technik, durch den Gebrauch der Arsenspiegel nur Schätzungsmethoden.

Die exakten Titrationsmethoden finden ihre untere Grenze in der Größenordnung von etwa 10^{-2} g. Alle anderen Methoden können den Forderungen exakter Analytik nicht genügen.

In der folgenden Arbeit wird unter Verwendung einer Trübungsreaktion und ihrer nephelometrischen Messung eine Methode gegeben werden, die gestattet, ohne besondere technische Schwierigkeiten Arsenmengen zwischen 0,06 und 0,0005 mg Arsen quantitativ genau zu messen.

II. Das neue Reagens.

1. Die Ermittlung der Komponenten.

Nach Ablehnung des mit As_2O_5 gesättigten Chinin-Molybdänsäurereagenses nach *Chouchak* ergab sich als Aufgabe die Schaffung eines neuen Reagenses, das folgenden Anforderungen genügen mußte:

1. Das Reagens muß mit Arsenverbindungen nephelometrisch brauchbare Trübungen liefern, d. h. die Trübungen müssen homogen, stabil und in gleicher Dispersität stets reproduzierbar sein.

2. Das Reagens selbst muß farblos und optisch leer sein, darf also auch nicht fluoreszieren oder opaleszieren.

3. Das Reagens muß längere Zeit hindurch haltbar bleiben.

4. Das Reagens darf beim Verdünnen mit aqua dest. keinerlei Veränderungen zeigen.

5. Das Reagens muß hochempfindlich sein und soll — möglichst spezifisch — schon mit allerkleinsten Arsenmengen starke Trübungen geben.



In Anlehnung an die Idee von *P. Chouchak* wurde versucht, eine geeignete Alkaloid-Molybdatsäurelösung zu finden, die obige Bedingungen erfüllt. Das Phosphorsäurereagens nach *H. Kleinmann*[1]) (Strychnin-Molybdänsäurelösung) war unter den Bedingungen der Methodik unempfindlich gegen AsO_4'''. Es wurden daher zahlreiche Alkaloid-Molybdänsäure-Mineralsäureverbindungen empirisch durchprobt. Es stellte sich heraus, daß nur ein Teil der verschiedenen Alkaloidsalzlösungen mit Alkalimolybdatlösungen Fällungen zeigten. Diese Fällungen waren fast stets in Mineralsäuren löslich. Solche Mineralsäurelösungen wurden auf ihre Trübungsfähigkeit mit Arsenverbindungen erprobt.

Es wurden von Alkaloiden untersucht:

Nicotin, Atropin, Hyoscyamin, Cocain, Morphin, Chinin, Chinidin, Cinchonin, Euchinin, Vucin, Eucupin, Optochin, Strychnin, Brucin.

Die Chinabasen zeigten im allgemeinen in Verbindung mit Alkalimolybdat in mineralsaurer Lösung die Fähigkeit, mit Arsensäure Trübungen zu geben. Doch störte entweder die Fluoreszenz der Lösungen oder ihre Empfindlichkeit war zu gering. Andere Alkaloide zeigten zum Teil gar keine Reaktion mit Arsensäure oder nur mit hohen Konzentrationen der letzteren.

Weitaus am geeignetsten von allen Alkaloiden erwies sich das Cocain, welches als Hydrochlorid Verwendung fand, so daß, trotz der Schwierigkeiten der Beschaffung, das Cocain als Grundlage des Arsenreagenses gewählt wurde.

Das Molybdat brauchte nicht, wie bei der Phosphorsäurebestimmung nach *Kleinmann*, aus Molybdänsäure und Alkali erst bereitet zu werden, sondern es genügte, Lösungen des käuflichen Kaliummolybdats K_2MoO_4 *Kahlbaum* zu verwenden, das vor Benutzung mehrmals umkristallisiert wurde. Als Mineralsäure wurde Salzsäure verwandt.

Die verschiedenen Komponenten zeigten folgendes Verhalten: Gibt man zu einer Cocainhydrochloridlösung die Lösung eines Alkalimolybdats, so entsteht eine weiße Fällung. Diese Fällung ist in Mineralsäure, die man zutropft, löslich, und bei bestimmten Konzentrationen der angewandten Komponenten resultiert eine klare Lösung. Diese Verhältnisse sind in Wahrheit viel komplizierter, da das Entstehen einer sauren, klaren Lösung der Alkaloid-Molybdatverbindung sowohl von der Reihenfolge der miteinander gemischten Komponenten als auch von der Mischungsgeschwindigkeit abhängt. So kann man z. B. bei bestimmten Konzentrationen den Niederschlag Cocain-Molybdat bei

---

[1]) *H. Kleinmann*, Über die Bestimmung der Phosphorsäure, diese Zeitschr. **99**, 1/6, 115—144, 1919. *Derselbe*, Zur Methodik der nephelometrischen Phosphorsäurebestimmung, diese Zeitschr. **174**, 43, 1926.



raschem Vermischen mit einer bestimmten Säuremenge lösen, bei langsamem Zutropfen derselben aber nicht.

Die saure Lösung des Cocain-Molybdatniederschlags zeigt je nach den Konzentrationsverhältnissen der Komponenten verschiedene Eigenschaften:

Sie kann klar bleiben oder beginnt nach längerer oder kürzerer Zeit von sich aus, ohne fremde Zusätze, zu trüben.

Die Lösungen, die von sich aus nicht trüben, zeigen nun zum Teil die Eigenschaft, bei Verdünnungen mit aqua dest. — eventuell auch mit verdünnten Säurelösungen — in geringem Maße zu trüben. Die Fähigkeit, beim Verdünnen nicht zu trüben, erwies sich hauptsächlich bedingt durch den Säuregehalt. Nur Lösungen, die Verdünnungen mit aqua dest. oder schwacher Säure vertrugen und dann mindestens 1 bis 2 Stunden völlig klar blieben, kamen überhaupt als Reagenzien in Frage.

Solche klar bleibenden Lösungen wurden mit Arsenverbindungen (es wurden Lösungen von H_3AsO_4 in Konzentrationen von 1 bis 10 μg[1]) As/ccm verwandt) geprüft, ob sie empfindliche Trübungsreaktionen zeigten, und zwar mußte die Reaktion durch die Arsenverbindung spezifisch und nicht etwa durch Verdünnungsvorgänge, p_H-Verschiebung usw. bedingt sein.

Es zeigte sich im allgemeinen, daß die Lösungen, die an sich am unstabilsten waren, d. h. Eigentrübung zeigten, am empfindlichsten gegen Arsen waren, während die durch ihren höheren Säuregehalt stabileren Lösungen mit ihrer Stabilität auch unempfindlicher oder ganz unempfindlich gegen Arsen wurden, was leicht erklärlich war, da die Arsen-Cocain-Molybdattrübung in Säuren löslich ist. Komplizierter wurden die Verhältnisse wieder dadurch, daß diese Löslichkeit der Arsentrübung in Säuren keine geradlinige Funktion ist, sondern daß die Arsentrübung zuerst mit der Acidität zu einem Optimum ansteigt, um dann bei weiterem Steigen der Acidität bis zum Verschwinden abzufallen.

Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten mußten so variiert und das Mischungsverhältnis derselben derart ermittelt werden, daß eine klare Lösung entstand, die an sich und bei einer bestimmten Verdünnung mit aqua dest. stabil blieb, d. h. nicht trübte, gleichzeitig aber auch das Maximum der Empfindlichkeit gegen Arsenverbindungen zeigte.

Als Beispiel seien einige der Versuchsanordnungen gezeigt, die zu der endgültigen Reagenszusammensetzung führten.

---

[1]) In der folgenden Arbeit sind 0,001 mg stets als 1 μg bezeichnet.



2. Variation der Alkaloid- und Molybdatkomponenten.

Es wurden ½-, 1-, 2- und 4%ige Kaliummolybdatlösungen und 1-, 2- und 5%ige Lösungen von Cocainum hydrochloricum analytisch genau hergestellt. Mit diesen Lösungen wurden folgende Versuche angestellt:

Tabelle I.
Versuch über die Zusammensetzung des Reagenses.

Reagenskomponenten	Zur Auflösung des entstehend. Niederschlages notwendiger n/1 HCl-Zusatz	Zusatz von aqua dest.			
		+ 2 ccm	+ 4 ccm	+ 6 ccm	+ 8 ccm
1 ccm ½%ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1%ige Cocainlösung	0,5 ccm	etwas getrübt	etwas getrübt	etwas getrübt	etwas getrübt
1 ccm ½%ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 2%ige Cocainlösung	0,7—0,8 ccm	etwas getrübt	etwas getrübt	schwächer getrübt	kaum getrübt

Die Tabelle I besagt, a) daß zur Auflösung des durch Zusammengießen von 1 ccm ½%iger K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1%iger Cocainum hydrochloricum-Lösung entstehenden Niederschlags 0,5 ccm n/1 HCl erforderlich sind (ein weiterer Zusatz von n/1 HCl hat auf die Auflösung der zurückbleibenden Trübung keinen Einfluß mehr). *Die Eigentrübung des Reagenses* verschwindet oder ändert sich nicht bei Zusatz von 2,4... usw. ccm aqua dest.

b) daß zur Auflösung des durch Zusammengießen von 1 ccm ½%iger K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 2%iger Cocainlösung entstehenden Niederschlags 0,7 bis 0,8 ccm n/1 HCl erforderlich sind (ein weiterer Säurezusatz ist ohne Einfluß). *Die Eigentrübung des Reagenses* verschwindet oder ändert sich nicht bei Zusatz von 2, 4 ... usw. ccm destillierten Wassers.

Dieser Versuch wurde in der Form erweitert, wie ihn die Tabelle II wiedergibt.

Tabelle II.
Fortsetzung des Versuchs über die Zusammensetzung des Reagenses.

Reagenskomponenten	Zur Lösung des Niederschlages notwendiger HCl-Zusatz in ccm n/1 Lösung	Zusatz von aqua dest.			
		+ 2 ccm	+ 4 ccm	+ 6 ccm	+ 8 ccm
1 ccm 1%ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1%ige Cocainlösung	0,8—0,9	etwas getrübt	schwächer getrübt	sehr schw. getrübt	gar nicht getrübt
1 ccm 1%ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 2%ige Cocainlösung	a) 1,2—1,3	kaum merkliche Trübungen			
	b) 1,5—1,6	Minimum der bisher aufgetretenen Trübg.			
1 ccm 2%ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1%ige Cocainlösung	1,8—2	etwas getrübt	getrübt	getrübt	getrübt
1 ccm 2%ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 2%ige Cocainlösung	2,2	stärker getrübt	stärker getrübt	stärker getrübt	stärker getrübt

Mit steigendem Prozentgehalt der Reagenskomponenten wächst der zur Lösung des Niederschlags notwendige Säurezusatz. Eine von vornherein bestehende Eigentrübung im Reagens beeinträchtigt dessen Anwendungsmöglichkeit insofern, als gewöhnlich die Weiterentwicklung dieser Eigentrübung beim Stehen des Reagenses nicht unbeträchtlich ist.

Das Reagens: „1 ccm 1 %ige Kaliummolybdatlösung + 1 ccm 2 %ige Cocainlösung + etwa 1,6 ccm n HCl" ist, da es die geringsten Eigentrübungen, selbst bei großen Verdünnungen mit Wasser und auch nach längerer Zeit, aufweist, nach den bisherigen Feststellungen das beste.

Da aber neben der Unempfindlichkeit gegen Wasserverdünnungen die Reaktion auf Arsenlösungen für die Brauchbarkeit des Reagenses von entscheidender Bedeutung ist, wurden die eben geprüften Reagenszusammensetzungen dem folgenden Versuch unterworfen:

Je vier Gläser desselben Reagenses (z. B. 1 ccm ½ %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1 %ige Cocainlösung + 0,5 ccm n/1 HCl) wurden nacheinander beschickt:

Glas 1 mit 1 ccm aqua dest.
„ 2 „ 1 „ Arsenlösung.
„ 3 „ 2 „ aqua dest.
„ 4 „ 2 „ Arsenlösung.

Für die Versuche wurde eine Lösung von bereits stark verdünnter Arsensäure verwandt, um bei Beobachtung der Trübungen die Empfindlichkeit des Reagenses besser beurteilen zu können. Außerdem wurde die Versuchsreihe noch um zwei weitere Reagenskombinationen (mit 4 %iger Kaliummolybdatlösung) vermehrt, um gleichzeitig ein Urteil über den Wert einseitiger Verstärkung in der Zusammensetzung des Reagenses zu gewinnen.

Der notwendige Säurezusatz im Vergleich zu früheren Angaben ist zum Teil aus Zweckmäßigkeitsgründen verstärkt worden.

Tabelle III.

Versuch über die Zusammensetzung des Reagenses.

Nr.	Reagenskomponenten	n/1 HCl-Zusatz ccm	+ 1 ccm aq. dest.	+ 1 ccm Arsenlösg.	+ 2 ccm aq. dest	+ 2 ccm Arsenlösg.
1	1 ccm $^1/_2$ %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1 %ige Cocainlösung	0,5	etwas getrübt	trübe	etwas getrübt	stark getrübt
2	1 ccm $^1/_2$ %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 2 %ige Cocainlösung	0,8	etwas getrübt	trübe	kaum getrübt	stärker trübe
3	1 ccm 1 %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1 %ige Cocainlösung	1,3 (früher angegeben: 0,8—0,9)	sehr schw. getrübt	trübe	minimal getrübt	stärker trübe
4	1 ccm 1 %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 2 %ige Cocainlösung	1,7—1,8 (früher angegeben: 1,5—1,6)	klar	trübe	klar	stärker trübe

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr.	Reagenskomponenten	n/1 HCl-Zusatz ccm	+ 1 ccm aq. dest.	+ 1 ccm Arsenlösg.	+ 2 ccm aq. dest.	+ 2 ccm Arsenlösg.
5	1 ccm 2%ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1%ige Cocainlösung	2,1 (früher angegeben: 1,8—2)	fast klar	trübe	fast klar	trübe
6	1 ccm 2%ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 2%ige Cocainlösung	2,3	klar	trübe	klar	trübe
7	1 ccm 4%ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1%ige Cocainlösung	4,2—4,4	fast klar	schwach trübe	fast klar	schwach trübe
8	1 ccm 4%ige K_2MoO_4-Lösnng + 1 ccm 2%ige Cocainlösung	4,4—4,6	fast klar	sehr schw. trübe	fast klar	sehr schw. trübe

Die Tabelle III sagt folgendes:

1. Von den ersten vier Reagenzien ist die Zusammensetzung des schon früher hervorgehobenen vierten Reagenses die geeignetste, denn das Reagens bleibt nach seiner Zusammensetzung klar, ist also am haltbarsten und reagiert auch nicht wie die vorangehenden drei auf den hier angegebenen Zusatz von destilliertem Wasser von 1 bzw 2 ccm. Alle vier Reagenzien scheinen, abgesehen von der Eigentrübung von Reagens 1 bis 3, mit gleichen Arsenmengen gleich starke Trübungen zu geben.

2. Auch die folgenden vier Reagenszusammensetzungen sind einwandfrei klar und reagieren nicht merklich auf den Zusatz von destilliertem Wasser. Jedoch zeigen sie in deutlicher Abstufung eine mit wachsendem Kaliummolybdatgehalt im Reagens geringer werdende Empfindlichkeit, bei Zusatz von Arsensäure zu trüben.

Es ergab sich folgendes Resultat: Alle Reagenszusammensetzungen, deren Kaliummolybdatkomponente bei den gegebenen Konzentrationsverhältnissen der anderen Komponenten stärker als 1%ig ist, scheiden aus, denn ihre Empfindlichkeit auf Arsenlösungen ist zu gering bzw. das Einsetzen dieser Reaktion wird zu stark verzögert, wahrscheinlich durch den hohen Salzgehalt des Reagenses.

In Tabelle IV sind noch einmal alle Reagenskombinationen zusammengefaßt, deren Kaliummolybdatkomponente höchstens 1%ig ist; des weiteren ist der Säurezusatz bei den einzelnen Kombinationen in weiteren Grenzen variiert worden. Endlich werden noch zwei Versuche mit 5%iger Cocainlösung mitgeteilt, um zu zeigen, in welcher Weise sich eine Erhöhung der Cocainkonzentration im Reagens auswirkt. Bei allen Versuchen ist die früher angewandte Lösung von Arsensäure auf das Fünffache verdünnt worden, um die Empfindlichkeit der einzelnen Reagenzien besser verfolgen zu können.

Die Beobachtung der Versuche im Laufe der folgenden Stunden ergab:

Reagens 1. Beide Reagenzien (mit variierter Acidität) trüben bei Zusatz von destilliertem Wasser verhältnismäßig schnell im Verlauf einer Viertelstunde nach.

Tabelle IV.
Versuch über die Zusammenstellung des Reagenses.

Nr.	Reagenskomponenten	Notwendiger n/1 HCl-Zusatz ccm	+ 1 ccm aq. dest.	+ 1 ccm Arsenlösg.	+ 2 ccm aqua dest.	+ 2 ccm Arsenlösg.
1	1 ccm $^1/_2$ %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1 %ige Cocainlösung	a) 0,45	etwas trübe	trübe	kaum erkennbar getrübt	stärker trübe
		b) 0,55	nicht getrübt	trübe	klar	stärker trübe
2	1 ccm $^1/_2$ %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 2 %ige Cocainlösung	a) 0,75	Der Säurezusatz genügt nicht zur Lösung des Niederschlags			
		b) 0,85	sehr schw. getrübt	trübe	sehr schw. getrübt	stärker trübe
3	1 ccm $^1/_2$ %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 5 %ige Cocainlösung	a) 1,8	trübe	—	trübe	—
		b) 2,0	trübe	—	trübe	—
4	1 ccm 1 %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 1 %ige Cocainlösung	a) 0,9	wenig trübe	trübe	gar nicht getrübt	stärker trübe
		b) 1,2	sehr schw. getrübt	trübe	gar nicht getrübt	gut trübe
		c) 1,5	Hauch	trübe	gar nicht getrübt	gut trübe
5	1 ccm 1 %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 2 %ige Cocainlösung	a) 1,6	sehr minimal getrübt	trübe	klar	stärker trübe
		b) 1,8—1,9	klar	trübe	klar	trübe
6	1 ccm 1 %ige K_2MoO_4-Lösung + 1 ccm 5 %ige Cocainlösung	2,0 und mehr	Durchweg schnelle Flockenbildung			

Reagens 2. Das Reagens 2b ist etwa 25 bis 30 Minuten haltbar.

Reagens 3 und 6. Trotz der Anwendung verschieden großer Säuremengen (versucht bis zu 3,5 ccm n/1 HCl) wird die bei der Herstellung des Reagenses eintretende winzige Flockung, die sich schnell verstärkt, nicht verhindert. Beide Reagenzien scheiden deswegen aus.

Reagens 4. Die verschiedenen Säurezusätze beeinflussen die eintretende Eigentrübung in ihrer Intensität nur unwesentlich. Sie wirkt nach 15 bis 20 Minuten störend.

Reagens 5a. Die Trübungen mit der Arsenlösung sind gut, aber auch die Wasserzusätze trüben schon nach 40 bis 45 Minuten.

Reagens 5b. Nach 2 Stunden ist noch keine nennenswerte Eigentrübung wahrzunehmen; die Trübungen mit Arsen sind scheinbar noch etwas stärker wie unter Reagens 5a.

Die in Tabelle IV angestellten Versuche sind wiederholt worden; in jedem Falle wurde der Säurezusatz um ein Geringes erhöht; eine prinzipielle Änderung im Verhalten der Reagenzien trat nicht ein.

Es ergab sich speziell nach dem Verhalten von 5b in Tabelle IV folgendes: *Die Zusammensetzung 1 ccm 1%iger Kaliummolybdatlösung + 1 ccm 2%iger Cocainlösung + einem noch näher zu bestimmenden n/1 HCl-Zusatz (mindestens 1,7 bis 1,8 ccm n/1 HCl) stellte das geeignetste Reagens dar.* Mit ihr wurde daher weiter gearbeitet und zunächst für sie die optimale Säuremenge ermittelt.

3. Die Bestimmung des Säureoptimums bei gegebener Alkaloid- und Molybdatkonzentration.

Wie aus Tabelle IV ersichtlich ist, genügen etwa 1,8 ccm n/1 HCl, um den aus 1 ccm 2%ige Cocainlösung und 1 ccm 1%ige K_2MoO_4-Lösung entstehenden Niederschlag vollständig zu lösen. Bei dieser Menge resultiert ein klares Reagens, welches bei Zusatz von 1 bzw. 2 ccm aqua dest. klar bleibt und bei Zusatz geringster Arsenmengen praktisch verwertbare, genügend starke Trübungen bewirkt. Da das Reagens um so stabiler und seine Eigentrübung, auch bei Wasserzusatz, um so geringer ist, je mehr Säure es enthält, wurde untersucht, welches der maximale Säurezusatz ist, der bei diesen gegebenen Alkaloid- und Molybdatkonzentrationen die Empfindlichkeit des Reagenses gegen Arsensäure nicht schädigt.

Hierzu wurden von 10 Paar Gläsern jedes Glas mit 1 ccm 2%ige Cocainlösung + 1,5 ccm n/1 HCl beschickt. Zu Paar I der Gläser wurden 0, zu Paar II je 0,25 ccm n/1 HCl, zu Paar III je 0,5 ccm n/1 HCl usf. zugesetzt, ehe die bestimmte Menge Kaliummolybdat (1 ccm einer 1%igen Lösung) tropfenweise unter Umschütteln hinzugegeben wurde. Glas 1 eines jeden Paares wurde nach beendeter Herstellung der verschieden sauren Reagenzien mit 1 ccm aqua dest., Glas 2 mit 1 ccm Arsenlösung (enthaltend 0,005 mg/ccm H_3AsO_4) beschickt. Alle Gläser wurden mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 16 ccm aufgefüllt.

Der Versuch wird wiedergegeben in Tabelle V.

Tabelle V.

Reagensglaspaar		Weiterer Säurezusatz ccm	Verhalten	Glas 1 + 1 ccm aqua dest.	Glas 2 + 1 ccm Arsenlösung
I	Reagens enthaltend 1,5 ccm n/1 HCl +	0	Reagens annäh. klar	annähernd klar	Trübung gut
II		0,25	" " "	" "	" "
III		0,5	Reagens klar	klar	" "
IV		0,75	" "	"	Trübung noch gut
V		1,0	" "	"	Trübg. etwas schw.
VI		1,25	" "	"	" noch schw.
VII		1,5	" "	"	" ganz schw.
VIII		2,0	" "	"	—
IX		2,5	" "	"	—

Die Tabelle V zeigt, daß ein Gesamtgehalt von 2 ccm n/1 HCl bei den vorhandenen Bedingungen notwendig ist, um ein klares, auch bei Zusatz von 1 ccm aqua dest. klar bleibendes Reagens zu erhalten. Bei weiterer Vermehrung der Säuremenge nimmt die Trübungsfähigkeit mit Arsenlösungen ab.

Damit ist für die angewandte Versuchsanordnung die endgültige Zusammenstellung des Reagenses wie folgt gegeben: *1 Vol. Teil 1 % ige Kaliummolybdatlösung + 1 Vol. Teil 2 % ige Cocainlösung + 2 Vol. Teil n/1 HCl.*

Um eine klare Abfiltration des sich zuerst bildenden Niederschlags und hernach ein stets klar filtrierendes und haltbares Filtrat zu erhalten, wird folgende, die Reihenfolge der Mischung betreffende Vorschrift für die Reagensherstellung gegeben:

Man gibt zu 1 Vol. Teil 1 %iger Kaliummolybdatlösung 2 Vol. Teile n/1 HCl, schüttelt um und setzt dann weiter unter Umschütteln 1 Vol. Teil 2 %ige Cocainlösung hinzu. Die danach auftretende Trübung kann ohne weiteres sofort sehr leicht durch ein quantitatives Filter abfiltriert werden, und das Reagens ist zum Gebrauch fertig. Es ist vollständig wasserhell, und bleibt wochen-, selbst monatelang brauchbar. Es bildet sich nach 1 bis 2 Tagen in der Reagensflasche in geringem Maße eine gelbliche Fällung (Bodensatz); dieselbe stört aber nicht, und das über ihr befindliche klare Reagens kann bei Gebrauch entweder herauspipettiert oder auch wieder abfiltriert werden.

Alle bisher gemachten Angaben über die Eigenschaften des Reagenses beziehen sich auf das verhältnismäßig kleine Volumen von 6 ccm, wovon 4 ccm Reagens und 2 ccm Zusatzflüssigkeit waren. Da bei den praktischen Messungen diese Volumenverhältnisse zu eng sind, soll untersucht werden, wie sich das Reagens bei größeren Verdünnungen mit aqua dest. verhält und wieweit seine Empfindlichkeit gegen Arsenverbindungen dann gewahrt bleibt.

4. Das Verhalten des Reagenses in verdünnteren wässerigen Lösungen und seine Empfindlichkeit gegen Arsen.

Tabelle VI.

Reagenszusammensetzung: 1 ccm 1 %ige Kaliummolybdatlösung + 2 ccm n/1 HCl + 1 ccm 2 %ige Cocainlösung. Die Arsenlösung enthält 0,001 mg/ccm H_3AsO_4.

Weiterer Zusatz von aqua dest.	1. Reihe Gläser: Beobachtungen nach 30 Min.	1. Reihe Gläser: Beobachtungen nach 60 Min.	2. Reihe Gläser: Zusatz von 1 ccm Arsenlösung
Reagens 4 ccm + 0 ccm	klar	klar	—
1 „	„	„	Trübung gut
2 „	„	„	„ schwächer
4 „	„	„	„ schwach
8 „	„	„	Trbg. schwach wahrnehmb.

Die Tabelle VI zeigt, daß das Reagens bei Verdünnung mit aqua dest. 60 Minuten lang völlig klar bleibt. Weitere Versuche ergaben, daß auch Verdünnungen auf das Zehnfache seines Volumens mit aqua dest. die

Klarheit des Reagenses nicht beeinträchtigten. Aus den Versuchen der Tabelle VI folgt weiter, daß 0,001 mg H_3AsO_4 (= etwa 0,5 μg Arsen) in 13 ccm Volumen noch deutlich wahrnehmbar sind.

III. Untersuchungen über das Verhalten der mit dem neuen Trübungsreagens hergestellten Arsensäuretrübungen.

1. Arbeitsweise.

Bei allen Untersuchungen wurden folgende Prinzipien beobachtet:

Es wurden für alle zur Verwendung kommenden Salze, Säuren und sonstigen Präparate nur solche pro analysi, wenn möglich mit Garantieschein, gewählt.

Alle Versuche wurden mit fünfwertigem Arsen durchgeführt. Dreiwertiges Arsen gibt, wie Versuche zeigten, unter den gegebenen Bedingungen keine Trübungsreaktion.

Die Standardlösung wurde hergestellt, indem 1 g reinster Arsensäure (Acidum arsenicicum, pulv. *Kahlbaum*) in destilliertem Wasser zu 1 Liter gelöst wurde (die Lösung enthielt 1 mg/ccm H_3AsO_4). Durch Verdünnungen wurden Lösungen mit 0,1, 0,05 ... mg/ccm H_3AsO_4 erhalten.

Die anzuwendenden Lösungen wurden stets in einer derartigen Konzentration gewählt, daß 3 ccm die gewünschte Arsenmenge enthielten, damit durch das relativ große Volumen beim Pipettieren der unvermeidliche Meßfehler möglichst niedrig gehalten wurde. Sämtliche Lösungen müssen optisch völlig klar und frei von jeglichen Fasern sein. Alle Lösungen werden daher unmittelbar vor Gebrauch stets durch quantitative Blaubandfilter (*Schleicher* und *Schüll*) filtriert.

Das Reagens muß genau nach der oben gegebenen Vorschrift hergestellt und vollständig klar sein.

Alle Flüssigkeiten wurden in gedämpften Flaschen aufbewahrt; wegen der möglichen Abgabe geringer Mengen von arseniger Säure aus dem Glase an die Flüssigkeit wird die Anwendung von Porzellanflaschen empfohlen.

Alle Mischungen wurden derartig vorgenommen, daß zunächst die Untersuchungslösung hergestellt, dann die für das endgültige Volumen notwendige Menge destillierten Wassers hinzugefügt und zuletzt das Reagens hinzugegeben wurde.

Die Beobachtungen und Messungen der in der Folge mit dem neu geschaffenen Reagens in Arsenlösungen hergestellten Trübungen wurden mit dem Nephelometer[1]) nach *H. Kleinmann* vorgenommen; über die Technik und den Gebrauch des Meßinstruments muß auf die

[1]) Das Nephelometer wird von der Firma Franz Schmidt und Haensch, Berlin S 42, Prinzessinnenstr. 16, hergestellt.



diesbezügliche Literatur verwiesen werden[1]). Völlig genaue Beachtung der daselbst gegebenen Vorschriften, vor allem größte Sauberkeit beim Arbeiten sind unbedingt notwendig.

Hinsichtlich der Messungstechnik sei nur auf folgenden Umstand aufmerksam gemacht:

Die außerordentliche Empfindlichkeit des Reagenses auf Arsen, sowie die Ubiquität dieser Substanz bedingen, daß sich von den Tauchzylinderoberflächen aus beim Eintauchen in reagenshaltige Lösungen Arsentrübungen entwickeln können. Des weiteren haften bei Reihenuntersuchungen sehr leicht Trübungsreste an den Zylinderflächen, besonders in der Kittrille an der Nickelfassung. Es soll daher eine besondere Vorschrift für die Reinigung der Tauchzylinder gegeben werden:

Man säubert sie vor dem Beginn einer jeden Reihenmessung, indem man sie aus dem Apparat ausschraubt, sie wenige Augenblicke in einige Kubikzentimeter Reagensflüssigkeit legt, dann äußerst sorgfältig mit destilliertem Wasser abspült, wieder einschraubt und sehr gut mit einem Ledertuch trocknet. Nach jeder einzelnen Messung werden sie nur mit destilliertem Wasser bis zur Kittrille abgespült und mit dem Ledertuch getrocknet.

Es war nötig, sich den Raumverhältnissen des Nephelometers bei der Herstellung der zu untersuchenden Trübung anzupassen. Da die beiden Meßgläschen des Apparats (Makromethodik) je einen Rauminhalt von etwa 12 bis 14 ccm haben und andererseits einige Kubikzentimeter erforderlich sind, um das mit destilliertem Wasser gereinigte, mit der zu untersuchenden Trübung zu füllende Meßgläschen vorzuspülen, wurde für die endgültige Methodik das herzustellende Trübungsvolumen auf 16 ccm festgelegt.

2. *Reagensmengenbestimmung.*

Weiter unten wird gezeigt werden, daß der Wert 0,130 mg Arsensäure (H_3AsO_4) in 8 ccm Flüssigkeit als obere Grenze des Konzentrationsbereichs der mit dieser Methode meßbaren Arsenmengen anzusehen ist. Eine Reagensmenge, die die Ausfällung dieser Arsenmenge als kolloidales Arsen-Cocain-Molybdat quantitativ bewirkt, muß genügen, um auch jede unter diesem Wert liegende Arsenmenge kolloidal zu fällen. Es wurde deshalb zur Bestimmung der notwendigen Reagensmenge folgender Versuch angestellt:

---

[1]) *H. Kleinmann*, diese Zeitschr. **99**, 115—149, 1919; ebenda **137**, 1/3, 144, 1923; ebenda **179**, 4/6, 301, 1926; Kolloid-Zeitschr. **27**, 236, 1920; vgl. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. (Berlin 1923); Kolloid-Zeitschr. **36**, Heft 3, 1925.



10 Paar Reagenzgläser wurden mit je 1 ccm einer 0,130 mg H_3AsO_4 pro Kubikzentimeter enthaltenden Arsenlösung beschickt, ansteigend vom ersten Paar wurden 0 bis 14 ccm Reagens hinzugegeben und die Gläser mit aqua dest. auf 16 ccm aufgefüllt. Alle Gläser wurden nach 15 Minuten mit einem festen Trübungsstandard verglichen:

0 0,5 1 2 4 6 8 10 12 14 ccm Reagens
+ 1 ccm Arsenlösung
+ aqua dest. ad 16 ccm

——→ ——→
Trübung ansteigend Trübung abnehmend

Der Versuch zeigt, daß die Trübung bis zu etwa 4 ccm Reagenszusatz ansteigt, um bei weiterem Reagenszusatz wieder abzunehmen. Es reichen also 4 ccm Reagens aus, um eine optimale Trübungsstärke zu erzeugen, und weiterer Reagenszusatz vermehrt die Trübung nicht, sondern hellt sie — wohl durch die größere Säuremenge im System — wieder auf. Trotzdem wurde aus Gründen der Stabilität und Homogenität eine Reagensmenge von 8 ccm in 16 ccm Volumen = 50 Vol.-% allen weiteren Versuchen zugrunde gelegt. Die Löslichkeit der Trübung in dieser Reagensmenge ist nicht so groß, daß die Proportionalität der Trübungen bei verschiedenen Konzentrationen (siehe unter III, 5) merkbar beeinflußt wird.

3. *Stabilität und Wachstumszeit der Trübungen.*

Im folgenden werden aus der Menge der angestellten Versuche zwei als Beispiele wiedergegeben, die das Verhalten der einzelnen Trübungen bei verschiedenen Arsenkonzentrationen erkennen lassen. Die Trübungen wurden sofort nach ihrem Ansetzen gegen einen festen Trübungsstandard [nach *H. Kleinmann*[1])], der auf gleiche Färbung eingestellt war, gemessen und in Abständen von 5 Minuten fortlaufend über eine Zeit von 60 Minuten messend beobachtet. Die Arsenkonzentrationen der untersuchten Trübungen betrugen 100 bis 5 μg Arsensäure in 16 ccm Gesamtvolumen.

Tabelle VII.

Versuch zur Prüfung der Konstanz der Trübung mittels H_3AsO_4. 3 ccm Arsensäurelösung (enthaltend *0,1 mg* H_3AsO_4) + 5 ccm aqua dest. + 8 ccm Reagens (wie oben angegeben) eingestellt gegen einen Trübungsstandard.

Nach Minuten:	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Durchschn. v. 5 Ablesungen	7,3	7,2	7,3	7,1	7,3	7,0	7,1	7,0	7,1	7,3	7,1	7,0
Verglichen mit	K = 40 (Trübungsstandard)											
Bemerkung	Leicht einsetzende Flockung nach 35 bis 40 Min.											

[1]) l. c.

Tabelle VIII.

Versuch zur Prüfung der Konstanz der Trübung mittels H_3AsO_4.
3 ccm Arsensäurelösung (enthaltend *0,005 mg* H_3AsO_4) + 5 ccm aqua dest. + 8 ccm Reagens (wie oben), eingestellt gegen einen Trübungsstandard.

Nach Minuten:	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Durchschn. v. 5 Ablesungen	40,2	40,1	40,0	39,5	38,1	37,9	37,9	37,8	37,8	37,8	37,6	37,8
Verglichen mit	$K = 10$ (Trübungsstandard)											

Unsere Versuche zeigten, daß die Trübungen je nach der Dichte des Systems nach etwa 35 bis 50 Minuten sichtbar inhomogen werden. Diese „*Flockungen*" ändern aber an der nephelometrischen Ablesung, d. h. an der Stabilität der Trübungen nichts.

Bei dieser Gelegenheit muß auf eine Eigenart der Methodik hingewiesen werden. Es ist bemerkenswert, daß jede entwickelte Trübung in ihrer Stärke erhalten bleibt, wenn eine „Flockung" schon mit bloßem Auge erkennbar ist. Für alle bisher beschriebenen Methoden der Nephelometrie, ausgenommen die Phosphorsäurebestimmung nach *H. Kleinmann*, bedeutet die „Flockung" einer Trübung das Ende ihrer Eignung zur Messung. In der vorliegenden Methodik ist ebenso wie im Falle der Phosphorsäuremethodik nach *H. Kleinmann* mit dem Sichtbarwerden der Flockung die Meßbarkeit für alle Konzentrationen immer noch gegeben. Die Trübungen bleiben also für die Dauer der Untersuchungen stabil trotz der erkennbaren, leichten „Flockung". Erst bei einer gröberen *Sedimentation der Flockung* ändert sich plötzlich und rasch abfallend die Trübungsstärke, womit die Meßbarkeit aufhört.

Was die Zeitdauer anbetrifft, innerhalb der die Trübungen einen Maximalwert erreichen, sowie die Zeitdauer, während der sie auf diesem Maximalwert verharren, so ist aus den Tabellen ersichtlich, daß beide Zeiten von den Arsenkonzentrationen abhängig sind. Konzentriertere Lösungen wachsen rasch, fast augenblicklich zum maximalen Trübungswert heran, verharren dann aber auf diesem Maximalwert bis zum Eintritt gröberer Flockung (in diesem Augenblick nimmt die Trübungsstärke rapide ab), kürzere Zeit, als Lösungen niedrigerer Arsenkonzentrationen, die länger stabil und konstant bleiben, dafür aber längerer Zeit zur Erreichung ihres Trübungsmaximums bedürfen.

Wachstumszeiten und Stabilitätszeiten liegen aber bei allen untersuchten Konzentrationen so günstig, daß sie den Ausbau einer Methodik ermöglichen.

Da aber die Stabilitätszeit der stärksten Trübungen dann so knapp wäre, daß einem nur ganz geringe Zeit zur Messung übrig bliebe, so ist es nötig, Messungsvorschriften für *zwei* Gruppen von Arsenmengen zu geben:

Überschreitet die Arsenkonzentration etwa 10 μg H_3AsO_4, was sich nach einiger Kenntnis der Methodik aus der Trübung bei gewöhnlicher Beobachtung leicht schätzen läßt, so soll die Trübung 15 Minuten stehen und dann gemessen werden. Man hat dann bestimmt das Trübungsmaximum vor sich und hat je nach der Arsenkonzentration 20 Minuten bis 1 Stunde und mehr Zeit zur Messung. Unter einem Arsengehalt von 10 μg Arsensäure muß man erst 30 Minuten warten, ehe mit der Messung begonnen werden kann; man hat dann über 1 Stunde Messungszeit.

4. *Reproduzierbarkeit der Trübungen.*

Für die nephelometrische Brauchbarkeit der Methodik ist es notwendig, daß die eben beschriebenen, unter fest umrissenen Bedingungen konstanten und meßbaren Trübungen unter gleichen Umständen in ihrer Stärke wieder herzustellen sind. Es muß also festgestellt werden, ob die Trübungen unter gleichen Bedingungen wieder in gleicher Dispersität auftreten.

Die Versuche wurden derart angestellt, daß eine große Anzahl von Parallelversuchen (es werden immer zehn angegeben) gleichzeitig unter gleichen Bedingungen angesetzt wurden. An der Trübung des ersten Versuchs wurden diejenigen der folgenden neun Versuche gemessen. Es wurde das ganze Gebiet der in Frage kommenden Arsenmengen (etwa 125 bis 5 μg H_3AsO_4) in dieser Form systematisch durchprobt. Als Beispiel seien zwei Tabellen gegeben.

Tabelle IX.

Versuch betreffend Übereinstimmung von Parallelversuchen.
Je 3 ccm Arsensäurelösung (enthaltend 0,075 mg H_3AsO_4) + 5 ccm aqua dest. + 8 ccm Reagens (wie oben) in zehn Gläsern.

Glas:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Durchschn. von 5 Ablesungen	—	30,0	29,95	29,9	30,0	30,0	29,9	29,95	29,8	30,0
Verglichen mit	Glas 1 = 30									
Abweichung . . . . %	—	0	+0,1	+0,3	0	0	+0,3	+0,1	+0,6	0

Der durchschnittliche Fehler beträgt etwa 0,2%.

Tabelle X.

Versuch betreffend Übereinstimmung von Parallelversuchen.
Je 3 ccm Arsensäurelösung (enthaltend 0,008 mg H_3AsO_4) + 5 ccm aqua dest. + 8 ccm Reagens (wie oben) in zehn Gläsern.

Glas:	1	2		4	5	6	7	8	9	10
Durchschn. von 5 Ablesungen	—	39.2	39.2	40.05	39,8	41.2	40.2	39.0	40.2	40,45
Verglichen mit	Glas 1 = 40									
Abweichung . . . . . . %	—	+ 2	+ 2	—0,1	+0,5	— 3	—0,5	+ 2,5	—0.5	— 2

Die Versuche zeigen, daß unter gleichen Bedingungen gleiche Arsenmengen gleiche Trübungen liefern. Es werden also unter gleichen Bedingungen stets gleiche Dispersitäten erhalten, wodurch die Vorbedingungen für die nephelometrische Analyse gegeben sind.

Daß auch verschiedene Konzentrationen bei gleichem Milieu gleiche Dispersitäten an trübenden Substanzen liefern, wird durch die unter III, 5 gegebenen Versuche über Beziehung zwischen Trübung und Konzentration gezeigt werden. Die Übereinstimmung der Parallelversuche ist ausgezeichnet, besonders bei Trübungen mit einem Arsengehalt über 0,015 mg Arsensäure. Bei den schwächeren Trübungen können störende Faktoren, wie Verunreinigungen (z. B. Fasern) der Lösung, die auch Licht geben, den Fehler etwas vergrößern.

Im Durchschnitt zeigen die Versuche mit Trübungen über 15 μg H_3AsO_4 = etwa 7,5 μg As keine Abweichung über $^3/_4$ bis 1 %, unter diesem Wert im Durchschnitt etwa 2 %. Selten auftretende Ausfälle, die völlig aus dem Rahmen der Messung fallen, werden in der endgültigen Analytik durch stetes Arbeiten mit mindestens drei Parallelen vermieden.

5. Untersuchungen über die Beziehung zwischen Trübung und Konzentration.

Für die weitere Gestaltung der Methodik mußte die Funktion zwischen der Stärke der Trübung und der Konzentration der Lösung an Arsen ausgearbeitet werden.

Es wird das ganze Messungsgebiet so durchgeprüft, daß Trübungen, die durch 10—20—40—80 μg H_3AsO_4 bedingt wurden, miteinander verglichen wurden.

Tabelle XI.

Untersuchung von Lösungen verschiedener Konzentrationen auf Trübungsproportionalität.

Die Lösungen a_1, a_2, a_3, a_4 enthalten 1 bis 8 ccm H_3AsO_4-Lösung, von (0,01 mg/ccm H_3AsO_4) 8 ccm Reagensflüssigkeit und sind mit aqua dest. auf 16 ccm aufgefüllt. In der Konzentrationsbreite 0,01 bis 0,08 mg H_3AsO_4 verhalten sich also:

$$a_1 : a_2 : a_3 : a_4 = 1 : 2 : 4 : 8.$$

	a_4		a_3		a_2		a_1	
Arsenlösung . . ccm	8		4		2		1	
Durchschn. v. 5 Ables.	20,0	19,95	20,1	40,0	20,4	40,15	30,7	40,0
Verglichen mit . . .	a_4 = 20		$a_4 = 10$	$a_4 = 20$	$a_3 = 10$	$a_3 = 20$	$a_2 = 15$	$a_2 = 20$
Abweichung . . . %	0	+ 0,25	— 0,25	0	— 2	— 0,3	— 2,1	0

Der vorliegende Versuch kann als Beweis dafür dienen, daß die Trübungsstärken sich direkt proportional den Konzentrationen an Arsen, also umgekehrt proportional den Höhen der belichteten Tyndallkegel verhalten.

Sowohl in Tabelle XI wie in den nachfolgenden Tabellen wurden stets als größtes Verhältnis beim Vergleich der Trübungen die Konzentrationsverhältnisse 1 : 2 gewählt. Es ist an sich möglich, weiter über dieses Verhältnis hinauszugehen; dies empfiehlt sich aber nicht mit Rücksicht auf die Genauigkeit der Messung und dürfte in der Praxis auch nicht erforderlich sein.

Tabelle XII.

Untersuchung von Lösungen verschiedener Konzentrationen auf Trübungsproportionalität.

Die Lösungen a_1, a_2, a_3, a_4 enthalten 4 bis 8 ccm Arsensäurelösung (0,016 mg/ccm H_3AsO_4), 8 ccm Reagens und sind mit aqua dest. auf 16 ccm aufgefüllt. In den Konzentrationen 0,128 bis 0,064 mg H_3AsO_4 verhalten sich also:

$a_1 : a_2 : a_3 : a_4 = 4 : 5 : 6 : 8.$

	a_1	a_2		a_3		a_4	
Arsenlösung . . ccm	4	5		6		8	
Verglichen mit . . .	$a_1 = 25$	$a_1 = 40$		$a_2 = 42$		$a_3 = 40$	
Durchschn. v. 5 Ables.	25,0	31,9	32,1	35,0	34,7	31,1	30,1
Abweichung . . . %	0	+ 0,25	— 0,25	0	+ 0,75	ca. — 3	— 0,25

Tabelle XIII.

Untersuchung von Lösungen verschiedener Konzentrationen auf Trübungsproportionalität.

Die Lösungen a_1, a_2, a_3, a_4 enthalten 4 bis 8 ccm Arsensäurelösung (0,008 mg/ccm H_3AsO_4), 8 ccm Reagens und sind mit aqua dest. auf 16 ccm aufgefüllt. In den Konzentrationen 0,064 bis 0,032 mg H_3AsO_4 verhalten sich also:

$a_1 : a_2 : a_3 : a_4 = 4 : 5 : 6 : 8.$

	a_1	a_2	a_3	a_4
Arsenlösung . . ccm	4	5	6	8
Verglichen mit . . .	$a_1 = 40$	$a_1 = 40$	$a_2 = 36$	$a_3 = 40$
Durchschn. v. 5 Ables.	39,95	31,85	29,85	30,8
Abweichung . . %	+ 0,1	+ 0,3	+ 0,5	— 2,5

	a_1		a_2		a_3		a_4	
Arsenlösung . . ccm	4		5		6		8	
Verglichen mit . . .	$a_1 = 40$		$a_1 = 40$		$a_2 = 36$		$a_3 = 40$	
Durchschn. v. 5 Ables.	39,95	40,0	32,0	31,9	29,95	30,0	30,1	30,05
Abweichung . . %	+ 0,1	0	0	+ 0,3	+ 0,2	0	+ 0,3	+ 0,15

Tabelle XIV.

Untersuchung von Lösungen verschiedener Konzentrationen auf Trübungsproportionalität.

Die Lösungen a_1, a_2, a_3, a_4 enthalten 4 bis 8 ccm Arsensäurelösung (0,004 mg/ccm H_3AsO_4), 8 ccm Reagens und sind mit aqua dest. auf 16 ccm aufgefüllt. In den Konzentrationen 0,032 bis 0,016 mg H_3AsO_4 verhalten sich also:

$a_1 : a_2 : a_3 : a_4 = 4 : 5 : 6 : 8.$

	a_1	a_2		a_3		a_4	
Arsenlösung . . . . . ccm	4	5		6		8	
Verglichen mit	$a_1 = 30$	$a_1 = 45$		$a_2 = 45$		$a_3 = 40$	
Durchsch. von 5 Ablesungen	30,2	35,85	35,9	37,3	37,2	29,9	29,8
Abweichung . . . . . %	— 0,6	+ 0,3	+ 0,25	+ 0,5	+ 0,6	+ 0,25	+ 0,5

Tabelle XV.

Untersuchung von Lösungen verschiedener Konzentrationen auf Trübungsproportionalität.

Die Lösungen a_1, a_2, a_3, a_4 enthalten 4 bis 8 ccm Arsensäurelösung (1 ccm 0,002 mg H_3AsO_4), 8 ccm Reagens und sind mit aqua dest. auf ein Volumen von 16 ccm aufgefüllt. In der Konzentrationsbreite 0,016 bis 0,008 mg H_3AsO_4 verhält sich also:

$a_1 : a_2 : a_3 : a_4 = 4 : 5 : 6 : 8.$

	a_1	a_2	a_3	a_4
Arsenlösung . . ccm	4	5	6	8
Verglichen mit . . .	$a_1 = 30$	$a_1 = 45$	$a_2 = 42$	$a_3 = 40$
Durchschn. v. 5 Ables.	30,3	30,55	35,2	30,35
Abweichung . . %	— 1	+ 12	— 1/2	— 3/4

	a_1		a_2		a_3		a_4	
Arsenlösung . . ccm	4		5		6		8	
Verglichen mit . . .	$a_1 = 30$		$a_1 = 45$		$a_2 = 42$		$a_3 = 40$	
Durchschn. v. 5 Ables.	30,15	29,9	36,3	36,4	34,8	35,2	30,0	30,3
Abweichung . . %	— 1/2	+ 0,3	— 0,8	— 1,1	+ 1/2	— 1/2	0	— 1

Sodann wurden geringere Konzentrationsbreiten durch Variation des Arsengehalts in engeren Grenzen untersucht.

Die Tabellen XII bis XV geben einen Ausschnitt aus den Versuchen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Proportionalität zwischen Trübung und Arsengehalt vollständig gewahrt bleibt. Notwendige Voraussetzung für einwandfreie Messungen ist exakteste Arbeitsweise und große Sauberkeit bei der Benutzung des Meßinstruments. Der durchschnittliche Fehler der Messungen beträgt 0,5 %.

6. Einfluß von Elektrolyten.

Die Arsentrübungen wurden bisher immer in einem Volumen von 8 ccm einer vollkommen salzfreien Lösung von Arsensäure durch Zusatz einer bestimmten Menge Reagensflüssigkeit erzeugt.

Die Isolierung des Arsens aus den Aschenbestandteilen organischer Materialien machte es — wie weiter unten gezeigt werden wird — unmöglich, Arsen in wässeriger oder schwach saurer Lösung allein zur Bestimmung zu bringen; die Anwesenheit von Elektrolyten, speziell Salzen in der Untersuchungsflüssigkeit war unvermeidbar.

Es ergab sich daher die Aufgabe, den Einfluß der verschiedensten Salze wie Natriumchlorid, Natriumnitrat, Ammoniumsalze (andere Verbindungen kamen für die endgültige Methode gar nicht in Frage) unter Variation ihrer Konzentrationen auf Trübungen verschiedener Stärke zu untersuchen.

Es sollen in der Folge nacheinander die Untersuchungen über Zusätze von NaCl, $NaNO_3$, NaCl + $NaNO_3$, NH_4Cl wiedergegeben werden. Die später zu erörternde Eliminierungsart des Arsens nach der Veraschung macht es zu einer besonderen Notwendigkeit, hier den NaCl-Einfluß auf Arsentrübungen in der vollen Breite der Untersuchung wiederzugeben. Das Studium der anderen Salze wird, da es in seinen Ergebnissen völlige Analogie mit dem des Natriumchlorids aufweist, nur zusammenfassend behandelt werden.

Für die Versuche wurden zuerst je eine 5/n und eine n/1 Lösung der oben erwähnten Salze angefertigt. Aus diesen Lösungen wurden durch entsprechende Verdünnungen n/2, n/10, n/25, n/50, n/100, 2/n und 4/n Lösungen hergestellt.

Diese Salzlösungen wurden nun in ansteigender Menge derartig zu Arsenlösungen verschiedenster Konzentration zugesetzt, daß die Normalität der endgültigen Systeme an Salz von n/400 bis 1,25/n anstieg. Dann wurde, wie üblich, durch Reagenszusatz die Trübung eingeleitet.

Für die Herstellung der Salzlösungen wurden nur reinste Präparate verwendet.

a) Versuche mit Natriumchlorid.

α) Einfluß von Kochsalzlösungen auf das Reagens.

Tabelle XVI.

	Zugesetzte Salzlösung	Dauer der Beobachtung Std.	Ergebnis
8 ccm Reagens + 4 ccm aq. dest. +	4 ccm n/2 NaCl-Lösung	1	Lösung bleibt klar
	4 „ n „	1	
	4 „ 2 n „	1	
	4 „ 4 n „	1	kaum wahrnehmbar. Hauch
	4 „ 5 n „	1	minimal getrübt

Aus der Tabelle XVI geht hervor, daß 4 ccm einer 4/n oder schwächer konzentrierten Kochsalzlösung, einem Volumen von 8 ccm Reagens + 4 ccm aqua dest. zugesetzt, sich praktisch verhalten wie reines Wasser; sie haben auf das Reagens keinen Einfluß. 4 ccm einer 5/n NaCl-Lösung dem eben angegebenen verdünnten Reagensvolumen zugesetzt, rufen dagegen schon eine sichtliche, wenn auch minimale Trübung hervor. Ob die Trübung durch eine Wirkung größerer Elektrolytmengen auf das Reagens zustande kommt, oder ob durch sie lediglich der äußerst geringe Arsengehalt des angewandten Salzes (es gehören dazu weniger als 1 μg As) angezeigt wird, konnte zunächst noch nicht entschieden werden. Als aber beim Abschluß der Arbeiten Methoden entwickelt waren, Reagenzien nach dem Prinzip der Schneiderdestillation arsenfrei zu machen, wurde NaCl pro analysi, *Kahlbaum* nach dem S. 47 unter 1a geschilderten Prinzip gereinigt. Mit dem gereinigten Präparat wurden Ergebnisse erhalten, die der vorangehenden Tabelle XVI entsprechen. Es scheint also die beginnende hauchförmige Trübung nicht durch Arsenverunreinigungen bedingt zu sein. Eine Überschreitung des Salzgehalts des Untersuchungssystems über n/1 NaCl verbietet sich außerdem schon durch die unter III, 6 a) ε) folgenden Versuche.

β) Stabilität und Wachstumszeit kochsalzhaltiger Trübungen.

Da es zu weit führen würde, sämtliche durchgeführten Untersuchungen über variierte Salzzusätze bei den verschiedenen Arsenkonzentrationen hier tabellarisch zu reproduzieren, ist für die Wiedergabe der folgenden Versuche, die durch 0,05 mg H_3AsO_4 bedingte Trübung gewählt worden.

Tabelle XVII.

Prüfung auf Konstanz der salzhaltigen H_3AsO_4-Trübung.

3 ccm Arsensäurelösung (enthaltend 0,05 mg H_3AsO_4) + 1 ccm aqua dest. + *4 ccm n/1 NaCl*-Lösung + 8 ccm Reagens, eingestellt gegen Trübungsstandard.

Nach Minuten:	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Durchschn. v. 5 Ables.	13,6	13,8	14,0	14,3	14,3	14,3	14,3	14,35	14,4	14,3	14,4	14,45
Verglichen mit . . .	Trübungsstandard = *K* = 30											

Bemerkungen. Leichte Flockung nach 35 Minuten. Die Messung begann sofort; nach 15 Minuten vollständige Konstanz.

Die Gesamtflüssigkeit war n/4 *an NaCl.*



Tabelle XVIII.

Prüfung auf Konstanz der salzhaltigen Trübung.

3 ccm Arsensäurelösung (wie oben) + 1 ccm aqua dest. + *4 ccm 5/n NaCl*-Lösung + 8 ccm Reagens, eingestellt gegen Trübungsstandard.

Nach Minuten:	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Durchschn. v. 5 Ables.	30,0	29,9	29,95	30,0	29,9	29,9	29,9	29,9	29,9	29,9	29,9	30,1
Verglichen mit . . .	Trübungsstandard = K = 10											

Bemerkungen. Leichte Flockung nach etwa 35 Minuten. Die Messung wurde 20 Minuten nach Erzeugung der Trübung vorgenommen und war dann sofort konstant.

Die Gesamtflüssigkeit war 1,25/n *an NaCl.*

Die mit 0,05 mg Arsensäure angestellten Versuche zur Prüfung auf Konstanz salzhaltiger Trübungen ergeben, daß keine der angewendeten Salzmengen, selbst die bei der Prüfung des NaCl-Einflusses auf das Reagens als schädlich erkannte (1,25 Normalität des Gesamtvolumens an Natriumchlorid), irgendwie das Konstantwerden der Trübungen beeinflußt. Zu demselben Ergebnis führten die Untersuchungen bei anderen Arsenkonzentrationen. Es wurde die ganze Breite des Bestimmungsgebiets entsprechend durchprobt; immer wurden die Trübungen nach einer gewissen Zeit gut konstant. Was die Wachstumszeiten bis zur endgültigen Stabilität anbetrifft, so zeigten schon einmal die salzfreien Trübungen die Tendenz, mit immer kleiner werdendem Arsengehalt eine größer werdende Wachstumszeit für sich in Anspruch zu nehmen, ehe sie ihren Maximalwert erreichten. Bei den oben wiedergegebenen Versuchen mit 0,05 mg H_3AsO_4 zeigt sich nun mit zunehmender Salzkonzentration ein analoges Verhalten: Trübungen, die im Gesamtvolumen von 16 ccm n/400 bis n/200 an NaCl sind, sind ohne Wachstumszeit sofort stabil; Trübungen, die eine Salzkonzentration von n/100 bis n/40 aufweisen, brauchen bereits 5 bis 10 Minuten, solche, die n/8 etwa 15 Minuten, die n/4 ungefähr 20 und die endlich 1,25/n sind, reichlich 20 Minuten, ehe sie konstant und damit für die Messung brauchbar geworden sind.

Daraus ergibt sich, daß die Entwicklung der Arsentrübung um so mehr verzögert wird, je höher der Natriumchloridgehalt der betreffenden Lösung ist. Diese Erscheinung wird aber nur da deutlich sichtbar wo die Wachstumszeit an sich eine sehr kurze ist, also bei Lösungen mit relativ hoher Arsenkonzentration (wie in obigem Beispiel), bei denen ohne Salz das Maximum der Trübung kurz nach dem Mischen erreicht worden wäre. Bei Lösungen geringerer Arsenkonzentration, bei denen die Wachstumszeit sowieso ½ Stunde in Anspruch nimmt, ist der Einfluß des Salzes auf die Wachstumszeit kaum merkbar. So erfahren Trübungen mit einem Arsengehalt unter 0,01 mg H_3AsO_4 eine

Erhöhung ihrer Wachstumszeiten um etwa 5 Minuten (von etwa 25 auf 30 Minuten). Da weiter festgestellt werden konnte, daß selbst bei stärksten Trübungen, auch bei einem Salzgehalt von 1,25/n, eine schädigende Flockung bestenfalls erst nach 35 Minuten eintritt, resultiert aus diesen Versuchen für die Messung *salzhaltiger* Trübungen folgende praktische Vorschrift:

Trübungen, deren Salzgehalt sich in den erwähnten Grenzen halten muß [unter III, 6, a) ε) wird als Methodenvorschrift gegeben, daß der Salzgehalt des Untersuchungssystems n/1 NaCl nicht überschreiten darf], mit einem Arsengehalt zwischen 0,130 und 0,01 mg H_3AsO_4, werden 20 Minuten nach ihrer Herstellung in der darauffolgenden ¼ Stunde gemessen.

Trübungen, mit entsprechendem Salzgehalt, die weniger als 0,01 mg H_3AsO_4 enthalten, werden nach etwa 30 Minuten gemessen (salzfreie Trübungen dieser Art nach etwa 25 Minuten).

Für die Ausführung der Messung bleibt bei den höchstmeßbaren As-Konzentrationen 10 bis 15 Minuten, bei allen anderen Konzentrationen ½ Stunde und mehr Zeit.

γ) Reproduzierbarkeit NaCl-haltiger Trübungen.

Hier gilt das gleiche wie bei salzfreien Lösungen. Bei Trübungen mit einem Mindestgehalt von 0,01 mg H_3AsO_4 betrug der maximale Fehler der Übereinstimmung, wie bereits früher angegeben, 0,2 bis 0,3 %; Trübungen, die geringere Arsenmengen enthielten, stimmten mit einem durchschnittlichen Fehler von 2 % gut überein. Eine Tabelle diene als Beleg für diese Versuche.

Tabelle XIX.

Versuch betreffend Übereinstimmung von Parallelversuchen mit salzhaltigen Trübungen.

Je 3 ccm Arsensäurelösung (enthaltend 0,025 mg H_3AsO_4) + 1 ccm aqua dest. + 4 ccm n/1 NaCl-Lösung + 8 ccm Reagens in zehn Gläsern.

Glas:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Durchschn. v. 5 Ables.	—	29,9	29,9	30,1	30,05	30,0	29,85	Ausf.	30.0	29.9
Verglichen mit. . .	Glas 1 = 30									
Abweichung . . %	—	+ 0,3	+ 0,3	— 0,3	0	0	+ 0,5	—	0	+0.3

δ) Untersuchungen über die Beziehung zwischen Trübung und Konzentration in kochsalzhaltigen Trübungen.

Im folgenden wird geprüft, ob der Salzgehalt der Systeme einen Einfluß auf das Verhältnis Trübung : Konzentration besitzt. Die Prüfung umfaßte variierte Arsen- und Salzmengen. Tabelle XX zeigt als Beispiel einen Versuch mit einer $^1/_1$ Gesamtnormalität an NaCl der Trübungen und Arsenmengen zwischen 0,02 bis 0,08 mg Arsensäure.

Tabelle XX.

Untersuchung von salzhaltigen Trübungen verschiedener Konzentration auf Trübungsproportionalität.

Die Lösungen a_1, a_2, a_3, a_4 bestehen aus 1 bis 4 ccm einer Arsensäurelösung, die 0,02 mg/ccm H_3AsO_4 enthält, 4 ccm 4/n NaCl-Lösung, 8 ccm Reagens und sind mit aqua dest. auf 16 ccm aufgefüllt. In der Konzentration verhalten sich also $a_1 : a_2 : a_3 : a_4 = 1 : 2 : 3 : 4$. Von allen Lösungen wurden je zwei hergestellt.

	a_1		a_2		a_3		a_4	
Arsenlösung . . ccm	1		2		3		4	
Verglichen mit. . .	$a_2 = 20$		$a_4 = 20$		$a_2 = 30$		$a_2 = 40$	
Durchschn. v. 5 Ables.	40,1	39,65	40,0	40,0	20,2	20,1	20,1	19,85
Abweichung . . %	— 0,5	+ 0,9	0	0	— 1	— 0,5	— 0,5	+ 0,75

Weitere Versuche haben bestätigt, daß die Trübungsproportionalität zwischen salzhaltigen Trübungen vollständig gewahrt bleibt. Der durchschnittliche Ablesungsfehler ist nicht größer als bei den salzfreien Trübungen, also rund 0,5 %.

ε) *Einfluß des Kochsalzes auf die Trübungsstärke.*

Die folgenden Untersuchungen galten der Feststellung, ob der Salzgehalt eines Systems die Trübung gegenüber derjenigen eines Systems ohne Salz ändert. Es wurden verschiedene Arsenkonzentrationen mit variierten Salzlösungen geprüft.

Tabelle XXI.

Parallelversuch zwischen salzfreier und salzhaltiger Trübung.

3 ccm Arsensäurelösung (wie oben) + 5 ccm aqua dest. + 8 ccm Reagens (Vergleichslösung) verglichen mit 3 ccm Arsensäurelösung (wie oben) + 1 ccm aqua dest. + *4 ccm n/2 NaCl*-Lösung + 8 ccm Reagens.

Vergleichslös. $K = 30,0$	Untersuchte Lösung										
	nach Min.: 5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
Durchschn. v. 5 Ables. (30,0)	29,45	29,4	29,45	29,5	29,45	29,45	29,5	29,4	29,4	29,45	29,5

Bemerkungen. Leichte Flockung nach 35 Minuten. Die *Untersuchungslösung* war *n/8 an* NaCl. Die Messung begann eine Viertelstunde nach Erzeugung der Trübung.

Es ergibt sich aus den Versuchen, daß bis zur $^1/_1$ Normalität an Kochsalz die Untersuchungslösung mit der Vergleichslösung bei einem maximalen Abweichungsfehler von 1 bis $1\frac{1}{2}$ % gut übereinstimmt. Innerhalb dieser Fehlergrenzen hat also das Salz keinen Einfluß. Reihenversuche ergaben dasselbe Resultat.



Tabelle XXII.

Parallelversuch zwischen salzfreien und salzhaltigen Trübungen auf Trübungsproportionalität.

10 Gläser: Glas 1 bis 5 enthalten je 3 ccm Arsensäurelösung (wie oben) + 5 ccm aqua dest. + 8 ccm Reagens; Glas 6 bis 10 enthalten je 3 ccm Arsensäurelösung (wie oben) + 1 ccm aqua dest. + *4 ccm 4/n NaCl-Lösung* + 8 ccm Reagens. Sie werden in einer Reihe nacheinander gemessen.

Glas:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Durchschn. v. 5 Ables.	—	30,3	30,0	30,2	30,05	29,9	30,0	29,6	29,7	30,0
Verglichen mit . . .	Glas 1 = 30									
Abweichung . . %	—	— 1	0	—0,6	— 0,1	+0,3	0	+ 1,2	+ 1	0

Weiter wurde versucht, statt der in der letzten Tabelle angegebenen 4 ccm 4/n NaCl-Lösung 4 ccm 5/n NaCl-Lösung zuzusetzen, so daß die Untersuchungslösung 1,25/n an Natriumchlorid war. Tabelle XXIII gibt einen Reihenversuch dieser Art wieder.

Tabelle XXIII.

Parallelversuch zwischen salzfreien und salzhaltigen Trübungen auf Trübungsproportionalität.

10 Gläser: Glas 1 bis 5 enthalten je 3 ccm Arsensäurelösung (wie oben) + 5 ccm aqua dest. + 8 ccm Reagens; Glas 6 bis 10 enthalten je 3 ccm Arsensäurelösung (wie oben) + 1 ccm aqua dest. + *4 ccm 5/n NaCl-Lösung* + 8 ccm Reagens. Sie werden in einer Reihe nacheinander gemessen.

Glas:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Durchschnitt von 5 Ablesungen .	30,0	30,05	30,3	30,25	29,95	28,55	28,25	28,4	28,55	28,15
Abweichung . %	—	— 0,1	— 0,9	— 0,75	+ 0,1	+ 44	+ 5,3	+ 4,8	+ 4,4	+ 5,6

Bemerkung. Die salzhaltigen Trübungen (Glas 6 bis 10) waren 1,25/n an NaCl.

Das Ergebnis dieser Messungen war eine Zerstörung der Übereinstimmung zwischen salzhaltiger und salzfreier Trübung. Die salzhaltige Trübung hatte eine bedeutende Verstärkung erfahren, blieb aber sonst konstant. Die Ablesungswerte des vorstehenden Versuchs in den Zeiteinheiten zeigen, verglichen mit der Einstellungszahl (auf der Nephelometerskala) der Vergleichslösung eine Abweichung von 5 bis 6 %. Dieses Ergebnis ist leicht verständlich, da ja das Reagens selbst mit diesem Salzgehalt eine leichte Trübung zeigt.

Aus den Untersuchungen folgt, daß die zu messende Lösung (ihr Volumen betrug bisher immer 8 ccm) *ohne* das Volumen der zuzu-

setzenden Reagensmenge (8 ccm) im Höchstfalle 2/n an Natriumchlorid sein darf, damit die Arsensäuretrübungen unbeeinflußt bleiben. D. h. in absoluten Gewichtsmengen ausgedrückt: Die zu messende Lösung kann 1,17 g NaCl pro 10 ccm enthalten, ohne daß die Messung irgendwie beeinträchtigt wird. Diese, sowie die im folgenden angegebenen Begrenzungen der Salzzusätze gelten für Präparate pro analysi, *Kahlbaum*.

b) Versuche mit $NaNO_3$, $NaNO_3 + NaCl$ und NH_4Cl.
ergeben das gleiche Resultat.

7. Grenzen der Meßbarkeit und Genauigkeit der Messung.

Im vorangehenden sind Arsentrübungen im Nephelometer gemessen worden, die maximal 0,128 mg H_3AsO_4 = etwa 0,068 mg As und als kleinste Menge 0,005 mg H_3AsO_4 = 0,0026 mg As enthielten.

Die starke Trübung mit 0,068 mg Arsen flockt bereits nach etwa 20 bis 25 Minuten, so daß die Zeit ihrer Meßbarkeit schon ziemlich eng begrenzt ist. Alle Arsentrübungen von noch stärkerer Konzentration haben in noch weit stärkerem Maße die Neigung, auszuflocken und sind von der Messung auszuschließen. Indes ist dieses Moment zu umgehen, da man Lösungen stärkeren Arsengehalts auf ein entsprechendes Volumen verdünnen kann. 0,06 mg Arsen in einem Gesamtvolumen von 16 ccm ist also die oberste Grenze der Konzentrationsbreite, innerhalb welcher Arsenbestimmungsmessungen ausgeführt werden sollen.

Die Trübung von 0,0026 mg Arsen ist schon äußerst schwach; es bedarf einer halben Stunde, um sie ihren Maximalwert erreichen zu lassen. Sie ist als unterster Wert in der Makromethodik zu betrachten. Die Mikrotechnik des Meßinstruments bietet aber weiterhin die Möglichkeit, das Meßvolumen (Gesamtvolumen) auf den fünften Teil der bisher angewandten 16 ccm einzuengen, so daß als kleinste Menge 0,0005 mg Arsen quantitativ bestimmt werden können. Die Methode erlaubt also exakte Arsenbestimmungen in einer Breite von etwa 0,130 bis 0,001 mg Arsensäure, das sind rund 0,065 bis 0,0005 mg Arsen.

Qualitativ sind nach der gegebenen Methodenvorschrift (30 Minuten Wartezeit) in einem Volumen von 3 ccm noch etwa 0,0001 mg Arsen gut nachzuweisen.

Die Genauigkeit der Messungen hängt bei einer Trübungsmessung selbst in gewissen Grenzen von der Übung des Untersuchers ab. Es ist aber zweifellos, daß einige Tage Beschäftigung mit der Nephelometrie genügen, um den notwendigen Ablesungsfehler nicht größer als 0,5 bis 1 % auch bei schwachen Trübungen werden zu lassen. Die Übung vorausgesetzt, bedingt die Methodik der Arsenbestimmung in reinen Arsenlösungen einen durchschnittlichen Fehler von 1 bis 2 %. Höher

als 2 % braucht bei Arbeit mit Parallelen der Bestimmungsfehler niemals zu werden. Der durchschnittliche aus allen vorangehenden Versuchen errechnete Fehler betrug etwa 0,6 %.

8. Stoffe, die die Herstellung einer zur Messung geeigneten Trübung behindern.

Färbende Substanzen (z. B. in wässeriger Lösung gefärbte Salze wie $CuSO_4$) müssen abwesend sein, da sonst besondere Kautelen, wie Farbfilter usw., beim Nephelometrieren notwendig wären.

Außer diesem ist es unbedingt notwendig, die Arsenlösungen völlig von eventuell anwesenden Phosphorsäuren zu trennen. Phosphorsäuren bzw. Phosphate geben mit dem Cocain-Molybdatreagens eine hochempfindliche Trübung, die ungefähr dieselben Grenzen hat, wie die Arsentrübung mit diesem Reagens.

Antimonverbindungen stören in dem weiter unten ausgearbeiteten Methodengang nicht. Abgesehen davon, daß bei der Destillation des Arsens als $AsCl_3$ (Siedepunkt 130°) etwa anwesendes Antimon als $SbCl_3$ (Siedepunkt 223°) nur in Spuren übergehen dürfte, fallen diese in neutraler bzw. schwach saurer Lösung als unlösliche Verbindungen aus. Diejenigen Mengen dieser Substanz, die sich nach Abfiltration des Ungelösten noch in Lösung befinden können, werden, wie Versuche zeigten, vom Arsensäurereagens unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht erfaßt; die Arsentrübung bleibt völlig unbehindert. Es kommen daher für die nephelometrische Arsenbestimmung bei Zugrundelegung des weiter unten entwickelten Methodenganges Verunreinigungen durch Antimon nicht in Frage.

Diskussion des Ergebnisses des Abschnittes III.

Die Untersuchungen lassen erkennen, daß die Bestimmung von fünfwertigem Arsen in reinen oder salzhaltigen Lösungen exakte Ergebnisse ermöglicht. Für die Messung sind folgende Bedingungen zu erfüllen:

1. Das Arsen muß in seiner fünfwertigen Form als As_2O_5 vorliegen.

2. Die Untersuchungslösung an sich darf im Höchstfalle zweifach normal an NaCl, $NaNO_3$ *oder* NH_4Cl sein, d. h. sie kann in 100 ccm 11,69 g NaCl oder 17,0 g $NaNO_3$ oder 10,7 g NH_4Cl enthalten.

3. Die Untersuchungslösung muß neutral bzw. ganz schwach sauer sein.

4. Die Untersuchungslösung muß frei sein von gefärbten Substanzen und Phosphorsäureverbindungen.

Zusammenfassung.

Die Literatur der bisher bekannten Methoden zur Bestimmung kleiner Arsenmengen zeigt, daß eine Methode zur exakten Messung

kleiner Arsenmengen bis etwa 1 μg herunter für größere Bestimmungsbreiten fehlt. Es wird versucht, die nephelometrische Messung einer Arsentrübungsreaktion als Methodengrundlage zu benutzen.

Es wird ein geeignetes Trübungsreagens ausgearbeitet. Dasselbe muß selbst klar, stabil und verdünnungsfähig sein und muß mit Arsenverbindungen empfindliche, nephelometrisch geeignete Trübungen liefern.

Als geeignetes Reagens wird eine Cocain-Molybdat-Salzsäurelösung ausgearbeitet.

Die günstigste Zusammensetzung des Reagenses wird systematisch ermittelt. Es wird das Konzentrationsverhältnis aller Komponenten variiert und die Zusammensetzung gefunden, bei der das Reagens selbst klar und verdünnungsfähig bleibt und gleichzeitig gegen Arsenverbindungen empfindlich ist.

Es ergab sich als günstigste Zusammensetzung des Reagenses: 1 Vol.-Teil 1%iger Kaliummolybdatlösung + 2 Vol.-Teile n/1 HCl + 1 Vol.-Teil 2%iger Cocainlösung.

Die mit dem Cocain-Molybdänsäurereagens und Arsensäure erzielten Trübungen wurden auf ihre nephelometrische Eignung, wie: Stabilität, Wachstumszeit der Trübungen, ihr Auftreten in gleicher Dispersität, sowie die Beziehung zwischen Trübung und Konzentration geprüft. Es ergab sich, daß die Trübungen nach einer bestimmten Wachstumszeit ein Trübungsmaximum erreichen, auf dem sie genügend lange zur Messung verharren. Die Trübungen treten unter gleichen Bedingungen in gleicher Dispersität auf. Die sich hieraus ergebende proportionale Beziehung zwischen Trübung und Konzentration wurde bestätigt.

Das Verhalten der Trübungen im Elektrolytmilieu wurde mit Hilfe verschieden konzentrierter NaCl-, $NaNO_3$-, NaCl- + $NaNO_3$- und NH_4Cl-Zusätze (nur ein Gehalt an diesen Salzen kam für die endgültige Methodik in Frage) geprüft. Es zeigte sich, daß ein Elektrolytgehalt bis zu n/1 Natriumchlorid des Gesamtsystems (analog verhalten sich die anderen Salze) die nephelometrische Bestimmung nicht beeinflußt.

Die Grenzen des Meßbereichs wurden in der Makronephelometrie mit 60 bis 2,5 μg Arsen, für die Mikronephelometrie bis zu 0,5 μg Arsen festgelegt. Die Genauigkeit der nephelometrischen Trübungsmessung beträgt etwa 1%. Die Abwesenheit von Phosphorsäuren ist unbedingt notwendig; Antimonverbindungen können unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht stören.

Eine nephelometrische Methode zur Bestimmung kleiner Arsenmengen.

II. Mitteilung: Die Bestimmung von Arsen in beliebigen Materialien.

Von

Hans Kleinmann und **Fritz Pangritz.**

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 22. März 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I. Einleitung.

In der vorangehenden Arbeit ist die Bestimmung des Arsens in reinen oder begrenzte Salzmengen enthaltenden wässerigen Lösungen bearbeitet worden.

Für die analytische Aufgabe der Arsenbestimmung in beliebigen Substanzen war es notwendig, Methoden der Veraschung organischer Substanzen, die anschließende Isolierung des Arsens aus diesen Aschen, sowie überhaupt eine derartige Technik der Weiterverarbeitung zu geben, daß schließlich eine für die nephelometrische Bestimmung geeignete Endlösung zur Analyse vorliegt.

Obgleich in der Literatur eine große Anzahl von Methodenvorschriften zur Veraschung und Isolierung des Arsens für Bestimmungen in den verschiedensten Formen gegeben sind, bot diese Aufgabe wesentliche Schwierigkeiten. Um eine praktisch brauchbare Methode zu geben, war es notwendig, relativ große Mengen organischer Substanz ohne den geringsten Verlust auch nur von Bruchteilen von 1 μg [1]) Arsen zu zerstören, diese Zerstörung durch Reagenzien zu bewerkstelligen, die auch in größerer Menge keine irgendwie nennenswerten Mengen As in das Untersuchungsmaterial bringen und schließlich das Arsen in einer klaren, farblosen, nur geringe Salzmengen enthaltenden Lösung vorliegend zu erhalten. Auch die Isolierung von Arsen aus Aschen und

---

[1]) 1 μg = 0,001 mg.

anorganischen Materialien bot bei der Forderung quantitativen Verlaufs bei Größenordnungen von nur wenigen μg Arsen neue Aufgaben.

Für die Zerstörung größerer Mengen organischer Substanz ergaben sich prinzipiell folgende Möglichkeiten:

1. Trockene Verbrennung in einem geschlossenen System.
2. Trockene Verbrennung durch Oxydationsschmelzen.
3. Nasse Veraschung mittels oxydierender Salze wie Chlorate, Permanganate usw.
4. Nasse Veraschung mittels Schwefel-Salpetersäure.

Für die weitere Verarbeitung nach Zerstörung der organischen Begleitstoffe kamen in Frage:

1. Direkte Bestimmung des Arsens in der durch Säuren oder Alkalien hergestellten und dann neutralisierten Lösung des Arsens mitsamt allen Aschebestandteilen oder anorganischen Begleitstoffen.
2. Isolierung des Arsens als AsH_3 und Wiedergewinnung als Alkaliarsenat.
3. Isolierung des Arsens als Trichlorid und Wiedergewinnung als Alkaliarsenat.

Alle diese verschiedenen Methodenmöglichkeiten sind in vorliegender Arbeit erprobt worden.

Es soll auf die einzelnen negativen Ergebnisse nicht eingegangen werden.

Auf Grund unserer Untersuchungen kamen die Veraschungsmethoden 1 bis 3 für die vorliegende Methode zur Bestimmung kleiner Arsenmengen nicht in Frage, weil sie entweder unvollkommen, oder sehr umständlich sind bzw. die endgültige nephelometrische Arsenbestimmung überhaupt unmöglich machen.

Das weitaus geeignetste Verfahren ist die nasse Veraschung mittels Salpetersäure-Schwefelsäure; es mußte aber für unsere Methode noch besonders modifiziert werden.

Die Anwendung bestimmter Veraschungsmethoden bedingt mitunter gleich die Anwendung der Isolierungsform, wie z. B. die *Lockemann*sche Oxydationsschmelze sein Eisenhydroxydverfahren. Außer dem Adsorptionsverfahren kommt für die Isolierung des Arsens aus der Asche

a) die Isolierung als Arsenwasserstoff,

b) die Isolierung als Arsentrichlorid in Frage.

Die dem *Marsh*schen Prinzip zugrunde liegende Isolierung des Arsens als AsH_3 verliert ihre Berechtigung, wenn man als Bestimmungsform nicht Arsenspiegel verwendet, denn die Isolierungsform wird einmal mit allen Kautelen der *Marsh*schen Apparatur belastet, zweitens führten eigene Versuche zu dem Ergebnis, daß die quantitative Oxydation von Arsenwasserstoff in einer für die Methode brauchbaren Weise wesentliche Schwierigkeiten bereitet.

Unbedingt den Vorzug verdient die Isolierung als Trichlorid. Dieses bekannte, ursprünglich von *Schneider* und *Fyfe* angegebene



Destillierverfahren stützt sich auf die große Flüchtigkeit des Arsenchlorürs (Siedepunkt 130°). Das in der Veraschungsflüssigkeit als Arsensäure vorliegende Arsen wird nach *E. Fischer*[1]) durch Zusatz eines Ferrosalzes zu As^{III} reduziert und dann im Salzsäurestrom als $AsCl_3$ in eine geeignete Vorlage (Wasser, Lauge o. a.) überdestilliert. Nach *R. Bunsen*[2]) ist der Zusatz von etwas Bromwasserstoff oder Kaliumbromid der Beschleunigung der Reduktion dienlich, nach *Ramberg*[3]) ist er unbedingt erforderlich, wenn man vollständige Reduktion des As^{V} erzielen will. *P. Jannasch* und *T. Seidel*[4]) haben das Ferrosalz durch Hydrazinsulfat ersetzt. Nach *O. Billiter* ist auch letzteres entbehrlich[5]), da bereits Chlorwasserstoff und Bromwasserstoff die Reduktion bewirken; für größere Mengen Arsen trifft das aber bestimmt nicht zu. Nach der heute allgemein üblichen Art benutzt *Billiter* die stark schwefelsaure Veraschungslösung zur Salzsäureentwicklung, vermeidet also die direkte Anwendung der schwer von Spuren Arsen zu befreienden Salzsäure, indem er sie auf ein Gemisch von Natriumchlorid und Kaliumbromid im Destillierkolben fließen läßt, und erhitzt. Für 20 g Schwefelsäure soll sich die Anwendung von 2 g NaCl + 0,2 g KBr als das günstigste Verhältnis herausgestellt haben. *I. Bang*[6]) arbeitet ähnlich, ersetzt nur das Kochsalz durch Kaliumchlorid, da es reiner ist; um ein quantitatives Übergehen des Arsens als $AsCl_3$ zu erreichen, glaubt er aber weit größere Salzmengen anwenden zu müssen. Das *Bang*sche Verfahren wurde genau nachgeprüft. Es sei hier nur erwähnt, daß das modifizierte Destillierverfahren vollauf zufriedenstellende Resultate geliefert hat.

II. Beschreibung der für die nephelometrische Methodik ausgearbeiteten Veraschung und Eliminierungsweise.

1. *Veraschungsmethodik.*

Im folgenden wird die Veraschungsmethode beschrieben, die sich nach zahlreichen Versuchen als die zweckmäßigste ergeben hat. Aus Gründen der Übersicht wird die Veraschungsmethode gemäß dem Arbeitsgang vor der Isolierung gegeben. Experimentell wurde zuerst die Isolierungsmethodik an reinen Arsenlösungen ausgearbeitet und

---

[1]) *E. Fischer*, Liebigs Ann. d. Chem. **208**, 196, 1881.

[2]) *R. Bunsen*, ebendaselbst **192**, 321, 1878.

[3]) *Ramberg*, Ber. d. Schwed. Komm. 1919.

[4]) *P. Jannasch* und *T. Seidel*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 1218, 1910.

[5]) *O. Billiter*, Helv. chim. Acta **1**, 475, 1918.

[6]) *I. Bang*, Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Arsen. Diese Zeitschr. **161**, 193, 1925.



dann erst mit ihrer Hilfe die Vollständigkeit bzw. die Verlustfreiheit des Veraschungsprozesses in der Weise geprüft, daß gleiche Gewichtsmengen feinst gepulverten und gemischten Organtrockenpulvers ohne Arsenzusätze (Blindversuche) und mit variiert zugesetzten Arsenmengen verascht wurden.

a) Reinigung der Reagenzien.

Zu der unter 1. gegebenen Veraschungsmethodik sind eine Reihe Reagenzien notwendig, die teils — weil sie nur in geringen Quanten zur Verwendung kommen — direkt als Handelspräparat übernommen werden können, teils von Arsenspuren gereinigt werden müssen. Die Menge der zur Veraschung angewandten Reagenzien richtet sich nach der zu veraschenden Materialmenge. In vorliegenden Versuchen ist als Maximalmenge 100 g Frischorgan, das sind etwa 20 g Organtrockenpulver, angewendet worden.

Zur Verarbeitung dieser Maximalmenge sind im Höchstfall erforderlich:

a) 40 ccm reine konzentrierte Schwefelsäure.

b) 150 ccm konzentrierte rauchende Salpetersäure.

c) 1 ccm einer 10%igen $CuSO_4$-Lösung.

d) 2 g Kaliumchlorid.

e) 0,2 g Kaliumbromid.

f) 2 g Eisensulfat, oxydul. krist.

g) 1 ccm Perhydrol, *Merck*.

h) 1 ccm Salzsäure, 1,19 für forensische Zwecke.

i) 30 ccm n/1 Natronlauge.

Alle Präparate sind, soweit nichts anderes vermerkt, reinste Präparate pro analysi, *Kahlbaum*.

Würde man mit den oben angegebenen Präparatenarten und -mengen in weiter unten angegebener Form eine Blindbestimmung auf As ausführen, so würden sich insgesamt 35 bis 50 μg Arsen (1 μg = 0,001 mg) ergeben. Die größte Menge dieses Arsens steckt in der Salpetersäure; doch auch die Summation der geringen, in den einzelnen Reagenzien vorhandenen Arsenmengen bedingte eine Reinigung. Das Prinzip der Reinigung, das hier angegeben wird, beruht bei allen Reagenzien, mit Ausnahme der Salpetersäure, darauf, daß sie einer Art Schneiderdestillation unterworfen werden, d. h. daß aus ihnen nach Zusatz von $FeSO_4$ (als Reduktionsmittel) durch Erhitzen mit reinster Salzsäure in ganz geringen Mengen die letzten Arsenspuren als Trichlorid vertrieben werden. Im einzelnen sei die Reinigung angegeben von:

a) *Schwefelsäure.* 40 ccm konzentrierter H_2SO_4 pro analysi, *Kahlbaum*, abgedampft, hinterlassen einen (unsichtbaren) Rückstand, in dem sich mittels des Arsensäurereagenses einige μg Arsen nachweisen lassen (1 bis 2,5 μg As). Es wird daher stets eine größere Menge konzentrierter H_2SO_4 in der Weise gereinigt, daß man sie in eine große Porzellanschale, die möglichst flach ist, füllt, etwa 10% (Volumprozent) des unter II 1, *a*, γ angegebenen KCl-$FeSO_4$-Gemischs und 0,5% (Volumprozent) Kaliumbromid unter ständigem Rühren hinzugibt und die Säure unter öfterem Rühren etwa 1 bis 2 Stunden im Sieden erhält. Bei diesem Prozeß entweichen nach dem

Prinzip der sogenannten Schneiderdestillation selbst die geringsten Arsenspuren[1]).

β) Salpetersäure. Aus $NaNO_3$ pro analysi, *Kahlbaum*, mit Garantieschein und der unter *α*) gereinigten Schwefelsäure wird in einem Schliffdestillationsapparat nach *Liebig* nach stöchiometrischen Verhältnissen unter Verwendung von 2 Mol $NaNO_3$ und 1 Mol konzentrierter H_2SO_4 rauchende Salpetersäure entwickelt und abdestilliert. Es wird unter Ausbeute von etwa 80 % eine rauchende Salpetersäure gewonnen, die in 150 ccm (Abdampfrückstand nach vorsichtigstem Verdampfen untersucht) nur etwa 1 bis 2 μg Arsen enthält. Da selten die volle Salpetersäuremenge zur Anwendung gelangt, ist die Reinheit befriedigend. Salpetersäure, rauchend, *Merck*, reinstes Präparat, enthält in 150 ccm etwa 8 bis 10 μg Arsen.

γ) Reinigung des KCl. 100 Gewichtsteile gepulvertes KCl pro analysi, *Kahlbaum*, werden mit 10 Gewichtsteilen KBr und 5 Gewichtsteilen $FeSO_4$ (beide fein gepulvert) gemischt, um den Verhältnissen bei der Schneiderdestillation zu entsprechen, mit destilliertem Wasser zu einem dünnen Brei verrieben, mit einigen Kubikzentimetern Salzsäure für forensische Zwecke versetzt und auf dem Wasserbad, später auf kleiner Flamme, bis zur Trockne erhitzt. Eventuell wird diese Prozedur wiederholt.

Alle anderen Reagenzien kommen in so geringen Mengen zur Anwendung, daß man mit reinsten Präparaten, pro analysi, *Kahlbaum*, auskommen kann.

b) Veraschungsprozeß.

Nachfolgend wird der als geeignet befundene Veraschungsprozeß beschrieben.

Die zu veraschende Menge des sehr fein zerkleinerten und durch Erhitzen auf dem Wasserbad gut getrockneten Materials (bis zu 60 g Trockenpulver) wird in einen mindestens 300 ccm fassenden Kjeldahlkolben gebracht und mit einer je nach Art des Materials verschieden großen Menge arsenfreier, rauchender Salpetersäure versetzt. Unter Umständen tritt sofort heftige Reaktion ein, die dann mit einem starken Schäumen des Gemisches verbunden ist und ausreichende Kühlung des Kolbens in einem Wasserbade notwendig macht. Im allgemeinen jedoch setzt die Reaktion erst nach Verlauf einiger Minuten ganz ruhig ein und steigert sich nicht in dem Maße, daß eine Kühlung erforderlich ist. In jedem Falle können die Mengen von Material und rauchender Salpetersäure so gewählt sein, daß nach 25 bis höchstens 30 Minuten die ganze Masse bis auf das eventuell vorhandene Fett aufgelöst worden ist; die vollständig klare Flüssigkeit hat eine dunkelbraune Farbe. Nach dem vollkommenen Erkalten des Kolbens werden 20 bis 25 ccm konzentrierte, gereinigte arsenfreie Schwefelsäure und 10 bis 12 Tropfen

[1]) Nach Angabe von *G. Bodnar* und *Lili Eveline Roth*, Zeitschr. f. angew. Chem. 87, 1101, 1926) ist die Anwesenheit von ganz kleinen Cu-Mengen zur völligen Vertreibung der HCl notwendig. Es sollen daher der H_2SO_4 pro 10 ccm 2 mg Cu (*nicht mehr!*) in Form von $CuSO_4$ zugegeben werden.



einer 10 %igen $CuSO_4$-Lösung als Katalysator zugesetzt. Es gilt nun, die stark exotherme Reaktion des Gemisches so in Gang zu bringen, daß bei möglichst geringer äußerer Wärmezufuhr und dauerndem Vorhandensein eines gewissen Überschusses an rauchender Salpetersäure im Kolben, die Flüssigkeit in gelindes Kochen gerät, bei dem die Entwicklung eines Übermaßes von nitrosen Dämpfen vermieden wird. Oftmals setzt die Reaktion ein, wenn man den Kolbeninhalt eine Zeitlang kräftig schüttelt, größtenteils ist es notwendig, ihn eine kurze Zeit über der *Sparflamme* eines Bunsenbrenners zu erwärmen: Immer ist die Reaktion am Anfang so heftig, daß man den Kolben von der Flamme entfernen und außen gut kühlen muß. Hat die Reaktion und damit die Entwicklung der nitrosen Gase etwas nachgelassen, so wird der Kolben wieder über den Mikrobrenner gestellt und sofort unter fortgesetztem Erwärmen mit der tropfenweisen Zuführung von rauchender Salpetersäure begonnen. Hierzu empfiehlt sich am besten die Anwendung eines graduierten Meßhahntrichters mit zweimal stumpfwinklig gebogenem Ableitungsrohr, welcher über dem aufrecht stehenden Kolben so angebracht wird, daß der Hahn des Trichters gut reguliert werden kann und die ausfließende Salpetersäure direkt auf die Schwefelsäure im Kolben tropft. Es werden zuerst in etwas schnellerer Folge 10 bis 15 Tropfen rauchender HNO_3 zugelassen; dadurch wird die Reaktion im Kolben für den ersten Augenblick noch mehr abgeschwächt. Jetzt wird die Höhe des Kolbens über der Sparflamme so reguliert, daß bei einem Salpetersäurezusatz von 1 Tropfen pro 10 bis 12 Sekunden das gelinde Kochen des Kolbeninhalts bei dauernder Anwesenheit von HNO_3 und mäßiger Entwicklung von Stickoxyden anhält. Diese Einstellung ist wichtig. Im Laufe der Verbrennung werden jetzt nach und nach äußere Wärmezufuhr und Salpetersäurezusatz um ein geringes verstärkt, bis man nach Verlauf von 3 bis 5 Stunden zur vollen Flammengröße des angewandten starken Bunsenbrenners und zu einem Säureverbrauch von 1 Tropfen pro 4 bis 6 Sekunden gekommen ist. Unter diesen Umständen ist bei einer Menge von 20 g Organtrockenpulver die Veraschung nach etwa 7 bis 8 Stunden beendet. Hat der Kolbeninhalt eine gelbe Farbe angenommen, dann wird die Salpetersäurezufuhr abgestellt und der Kolben auf der vollen Flamme noch etwa 20 Minuten weiter erhitzt. Die Verbrennung ist vollständig und wird abgebrochen, wenn beim Entweichen von Schwefelsäuredämpfen die hellgelbe Farbe der Flüssigkeit unverändert bleibt bzw. weitere Aufhellung eintritt. Sollte infolge Kohleausscheidung in dem Gemisch die geringste Dunkelfärbung einsetzen, dann ist sofortige Entfernung der Flamme und schnelle und möglichst gründliche Abkühlung des Kolbens unter der Wasserleitung unerläßliche Bedingung. Nach der Abkühlung erst darf wieder rauchende Salpetersäure zugeführt werden, und zwar

muß die Behandlung mit dieser noch einmal mindestens eine Viertelstunde lang in derselben Art wie oben beschrieben fortgesetzt werden. Ändert sich nach dieser Zeit beim Erhitzen der schwefelsauren Lösung allein die Farbe nach 10 Minuten langem Kochen nicht mehr, dann ist die Veraschung beendet.

Die Vorzüge dieser Verbrennungsmethode liegen weniger in einer Zeitersparung, als in ihrer in jeder Beziehung praktischen Vollkommenheit. Es ist besser, eine Veraschung auf eine längere Zeit auszudehnen, als durch schnelleres Vorgehen Gefahr zu laufen, Arsenverluste zu erleiden. Durch die richtige Regulierung des Veraschungsprozesses sollen vor allem zwei Gefahrenmomente für den Verlust von Arsen ausgeschaltet werden: 1. die durch ungenügendes Vorhandensein des Oxydationsmittels bedingte Verkohlung des Veraschungsgemisches, und 2. die übermäßig starke Entwicklung nitroser Gase, die einen Verlust von Arsen auf mechanischem Wege durch Mitreißen zur Folge haben kann. Weiter soll erreicht werden, daß durch allmähliche Steigerung der Temperatur und des Salpetersäureverbrauchs dieses Verbrauchsquantum infolge absoluter Ausnutzung der Oxydationswirkung auf ein Mindestmaß reduziert bleibt und nur wenig Aufsicht während der Verbrennung notwendig ist.

Diese allgemeine Form der Veraschung muß je nach der Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials etwas modifiziert werden, und zwar betreffen diese Modifikationen im wesentlichen nur die Vorbehandlung des Materials und die Auflösung desselben. Organe, Leichenteile, Fleisch usw. müssen in gut zerkleinertem Zustande auf dem Wasserbad möglichst vollständig getrocknet werden (Herstellung von Trockenpulvern), Papier, Tapete werden sehr fein zerstückelt, Blut, Serum und andere Flüssigkeiten werden ebenfalls auf dem Dampfbad zur Trockne gebracht, ehe sie mit rauchender Salpetersäure behandelt werden.

Zur Lösung von beispielsweise 20 g des zerkleinerten und getrockneten Materials sind etwa 20 ccm rauchender Salpetersäure, zur vollständigen Veraschung nach obigem Schema etwa 70 bis 90 ccm rauchender Salpetersäure (bei fettreichem Material entsprechend mehr) erforderlich.

Bei der Verarbeitung von Harn sowie anderen stark NaCl-haltigen, sauer reagierenden Substanzen empfiehlt es sich, diese vor dem Eindampfen mit NaOH alkalisch zu machen; der Rückstand wird mit etwas destilliertem Wasser versetzt und durch *tropfenweises* Zugeben von *rauchender* Salpetersäure vorsichtig in Lösung gebracht.

Metalle (wie Zink u. ä.) werden in kleinen Stücken in einen Kjeldahlkolben eingetragen, der mit stark verdünnter (rauchender) Salpetersäure beschickt worden ist. Das Metall muß ziemlich hoch von der

Flüssigkeit bedeckt sein. Die Auflösung vollzieht sich dann bei ruhiger Entwicklung von Wasserstoff, der in der Lösung oxydiert wird.

Es wurde beobachtet, daß bei dieser sehr langsamen Wasserstoffentwicklung (5 g Zn werden in etwa 3 Stunden gelöst) die dem Zink zugefügten Arsensäuremengen quantitativ wiedergefunden wurden (vgl. Tabelle VII). Da aber eigene Versuche gezeigt haben, daß AsH_3 nicht quantitativ beim Durchleiten durch rauchende Salpetersäure oxydiert wird und diese Beobachtung auch neuerdings von *G. Lockemann*[1]) gemacht wurde, so ist es denkbar, daß bei den Analysen deshalb kein Arsenverlust eintrat, weil fünfwertiges Arsen in Gegenwart von rauchender Salpetersäure nicht zu Arsenwasserstoff reduziert wurde, während eine Reduktion bei Beimengungen von metallischem Arsen zum Zink eher möglich sein dürfte.

Es ist daher sicherer, die Auflösung des Zinks in einem geschlossenen System derart vorzunehmen, daß der entwickelte Wasserstoff noch einmal durch eine kleine Waschflasche mit einigen Kubikzentimetern Brom geleitet wird, da dieses nach *Lockemann* (l. c.) Arsenwasserstoff quantitativ absorbiert. Das Brom wird vorsichtig abgeraucht, um Arsenverlust auf mechanischem Wege zu vermeiden und der Rückstand mit der Zinklösung vereinigt und weiterverarbeitet. Bei Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure fällt Zinksulfat, das bei der nachfolgenden Destillation zur Eliminierung des Arsens erst wieder in Lösung gebracht werden muß, ehe mit voller Flamme erhitzt werden kann.

2. *Eliminierung des Arsens aus der Aschenlösung.*

a) Technik der $AsCl_3$-Destillation.

Als Isolierungsform ist die sogenannte Schneiderdestillation gewählt worden. Das Prinzip derselben ist folgendes: Das Arsen wird zu dreiwertigem Arsen reduziert und dann durch die aus KCl und der vorhandenen Veraschungsschwefelsäure entstehende HCl als $AsCl_3$ in eine geeignete Vorlage überdestilliert. *I. Bang*[2]) hat diese Destillationsmethode für Mengen von 5,0 bis 0,02 mg As ausgearbeitet und sich dabei einer Feststellung *Rambergs* bedient, der fand, daß die Anwesenheit von Bromiden in ziemlich geringer Menge eine notwendige Voraussetzung dafür ist, daß auch kleinste Mengen As von zweiwertigem Eisensalz in angemessener Zeit vollständig zu As_2O_3 reduziert werden, daß also das Bromid erst die Vollkommenheit der Destillation bedingt. *I. Bang* verwendet zur Reduktion und Destillation von Arsenmengen in den oben angegebenen Grenzen: zur Reduktion einen Teelöffel voll *Mohr*sches Salz bzw. Ferrosulfat; zur Destillation 20 g KCl, pro analysi, *Kahlbaum*, und 2 g reinstes Kaliumbromid.

---

[1]) *G. Lockemann*, Zeitschr. f. angew. Chem. **38**, 1125, 1926.

[2]) *I. Bang*, diese Zeitschr. **161**, 193, 1925.

Die Originaldestillation, wie sie *Bang* ausführt, war auf die vorliegende Methodik nicht übertragbar und wurde in folgender Weise abgeändert: Als Destillationsgefäß wurde ein 500 ccm fassender Jenaer Destillationskolben mit tiefem seitlichen Ansatzrohr benutzt, in den die Veraschungslösung aus dem Kjeldahl umgegossen wurde. Es ist notwendig, an Stelle des langhalsigen Kjeldahlkolbens, in dem die Verbrennung stattgefunden hat, einen Destillationskolben mit niedrig angesetztem Rohr zu verwenden. Hierzu führten schlechte Resultate bei Destillationen aus langhalsigen Kjeldahlkolben, selbst bei allmählich gesteigerten Destillationszeiten und noch schlechtere bei Verwendung von Kjeldahlkolben mit Tropfenfängeraufsatz. Der Destillationskolben wird oben mit einem Gummistopfen verschlossen und ebenfalls durch einen Gummistopfen mit einem schräg absteigenden Kugelkühler verbunden. Bei *Bang*[1]) findet sich die Angabe, daß man diese Gummistopfen vor dem Gebrauch einige Tage in wenig arsenfreie (forensische) Salzsäure legt oder ebensogut eine Zeitlang in verdünnter heißer Salzsäure beläßt, um sie von jeglichen Arsenspuren zu befreien. Es stellte sich heraus, daß *graue* Stopfen wohl von Anfang an, zum mindesten aber von der vierten oder fünften Salzsäuredestillation an nicht den geringsten Einfluß auf das Resultat der Untersuchung hatten. Das stumpfwinklig nach unten abgebogene Ableitungsrohr des Kugelkühlers mündet in eine Vorlage, die zur Aufnahme der Vorlageflüssigkeit (in diesem Falle n/1 NaOH) dient, und welche die aus der Abbildung ersichtliche Form hat. Sie besteht aus einer etwa 300 ccm fassenden Saugflasche, in welche mittels eines Gummistopfens oder eines Glasschliffes ein starkwandiges Reagensglas eingesetzt ist, das bis zum Boden des Gefäßes reicht und mit einem möglichst hoch, seitlich angesetzten, dicht am Glase nach unten gebogenen Ableitungsrohr versehen ist, welches seinerseits wieder fast auf den Boden der Saugflasche aufstößt (s. Abbildung). Das mit einem in die Reagenzglasöffnung passenden Gummistopfen versehene Ableitungsrohr des Kühlers wird nach dem Einfüllen der Vorlageflüssigkeit (in das Reagenzrohr der Vorlage!) in das Reagenzrohr eingeführt und festgeschlossen.

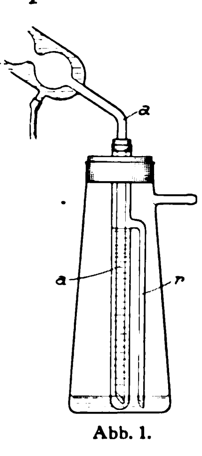


Abb. 1.

Diese Form der Vorlage, kombiniert mit dem Kugelkühler, hat sich bei den angestellten Untersuchungen und Destillationen besonders gut bewährt. Das Ableitungsrohr *a* des Kugelkühlers taucht tief in die Vorlagelauge ein, der Gasstrom wird durch zwei getrennte Teile der

[1]) l. c.

Lauge gedrückt, ehe er die Vorlage verläßt. Die Vorlageflüssigkeit paßt sich selbsttätig den Druckverhältnissen während der Destillation an, ohne jemals bei Unterdruck durch den Kühler in den Destillationskolben zurücksteigen zu können, weil, sobald ein Teil der Vorlageflüssigkeit in den Kugelkühler zurückgestiegen ist und das Rohr *r* austaucht, durch den seitlichen Tubus der Saugflasche Luft nachdringt. Bei Druckerhöhung kehrt die Vorlagelauge in ihre alte Lage zurück, so daß kein Verlust an Arsentrichlorid entstehen kann. Es ist weiterhin vorteilhaft, den Bodendurchmesser der Saugflasche möglichst klein zu wählen, weil damit erreicht wird, daß das Ableitungsrohr *r* des Reagenzglases möglichst tief in die Vorlageflüssigkeit eintaucht. Bei Anwendung dieser Vorlage ist nur wenig Aufsicht während der Destillation erforderlich.

Die Abdestillation des Arsentrichlorids in dieser Apparatur muß unbedingt in der Weise geschehen, daß während der ersten 5 Minuten so vorsichtig erhitzt wird, daß die Luftblasen nur in langsamer Folge die Vorlageflüssigkeit passieren. Erst wenn die Stärke des Gasstromes nachläßt und die vorgelegte Lauge langsam zurückzusteigen beginnt, wird mit voller Flamme gekocht und die Destillation nach 25 bis 30 Minuten abgebrochen.

b) Versuche an reinen Arsenlösungen.

a) Reduktion und Destillation.

Mit der eben geschilderten Apparatur wurden unter Zugrundelegung der *Bang*schen Anordnung Versuche an reinen Arsenlösungen angestellt, um festzustellen, bis zu welcher Größenordnung hinab Arsen sich einwandfrei als Arsentrichlorid überdestillieren läßt und welche Bedingungen, speziell welche Reagensmengen hierzu notwendig sind. Die quantitative Analyse des Destillats setzte die Kenntnis der Weiterbehandlung des Destillats bis zur nephelometrischen Messung voraus, die aus Gründen der Übersicht erst später gegeben wird.

Da die für die vorliegende Methode maximale Arsenmenge nur den zehnten Teil der von *Bang* verwendeten maximalen Arsenmenge darstellt, wurde zunächst geprüft, welches Mindestquantum KCl + KBr notwendig ist, um mit Sicherheit maximal 0,5 mg H_3AsO_4 quantitativ als $AsCl_3$ überzudestillieren. Die Anwendung einer möglichst geringen KCl-Menge war notwendig, um in der Vorlage möglichst geringe Salzmengen zu erhalten.

In den Destillationskolben wurden je 25 ccm konzentrierte, arsenfreie H_2SO_4, ferner variierte Arsenmengen bis zu 0,5 mg H_3AsO_4 maximal und 30 ccm aqua dest. gegeben. Nach Erkalten des Kolbens wurde die Reduktion durch Zusatz von etwa 2 g Eisensulfat (oxydul.) fein pulverisiert, bewirkt.

Die Vorlage wurde mit einer Menge n/1 NaOH gefüllt, die stöchiometrisch genügte, um mit Sicherheit ein alkalisches Destillat zu erhalten. Nach dem Zusammensetzen der Apparatur wurde der Destillationskolben mit den in Tabelle I angegebenen variierten Mengen KCl + KBr beschickt und sofort mit dem Gummistopfen verschlossen. Dann erfolgte die Destillation wie oben beschrieben.

Tabelle I.

Bei der Destillation angewandte Mengen KCl + KBr	Vorgelegte Mengen n/1 NaOH ccm	Zugesetzte Menge H_3AsO_4	Gefundene Menge H_3AsO_4 μg
5 g KCl + 0,5 g KBr	75	0,5 mg = 500 μg	510
5 g „ + 0,5 g „	75	0,5 „ = 500 „	507
3 g „ + 0,3 g „	45	0,2 „ = 200 „	204
3 g „ + 0,3 g „	45	0,5 „ = 500 „	508,5
2 g „ + 0,2 g „	30	0,2 „ = 200 „	204
2 g „ + 0,2 g „	30	0,5 „ = 500 „	502,5
1 g „ + Spur „	15	0,2 „ = 200 „	195
1 g „ + „ „	15	0,5 „ = 500 „	462,0
2 g „ + 0,2 g „	30	0 „ (blind)	2,4
2 g „ + 0,2 g „	30	0 „ „	2,5

Die Tabelle I zeigt:

1. Daß es bei Anwendung eines Gemisches von 2 g KCl + 0,2 g KBr noch gut möglich ist, 0,5 mg H_3AsO_4 quantitativ als $AsCl_3$ überzudestillieren; diese Salzmenge ist aber unbedingt für 0,5 mg H_3AsO_4 erforderlich.

2. Daß ein 10%iger Zusatz von KBr zu der angewandten Menge KCl die Reduktion des As^V zu As^{III} und damit die Destillation tatsächlich vollkommen macht. Mit anderen Mengenverhältnissen angestellte Versuche haben bewiesen, daß das hier gewählte Verhältnis KCl : KBr das günstigste ist; die von *Ramberg* gemachte Beobachtung kann also vollauf bestätigt werden.

Die Salzmenge von 2 g KCl + 0,2 g KBr ist also als Normalmenge bei den hier auszuführenden Arsendestillationen zu betrachten. Es ist allerdings nicht in jedem Falle möglich, diese 2 g KCl + 0,2 g KBr bei der Destillation zu benutzen. Die Normalmenge muß verkleinert werden, sobald die zu destillierende Arsenmenge kleiner als 0,0075 mg H_3AsO_4 ist. Darüber folgt Näheres weiter unten.

Tabelle II gibt Versuche über Destillationen kleiner Arsenmengen (unter 100 μg) wieder.

Tabelle II.

Angewandte Mengen KCl + KBr	Vorgelegte Menge n/1 NaOH ccm	Zugesetzte Menge H_3AsO_4	Gef. Menge H_3AsO_4 + Reag. Blindwert µg	Gefundene As-Menge µg
2 g KCl + 0,2 g KBr	30	0,1 mg = 100 µg	103,5	101,2
2 g „ + 0,2 g „	30	0,075 „ = 75 „	75	72,7
2 g „ + 0,2 g „	30	0,05 „ = 50 „	52,5	50,2
2 g „ + 0,2 g „	30	0,01 „ = 10 „	11,7	9,4
1 g „ + Spur „	15	0,005 „ = 5 „	7,7	6,1
1 g „ + „ „	15	0,005 „ = 5 „	7,1	5,5
2 g „ + 0,2 g „	30	0 „ (blind)	2,3*)	
1 g „ + 0,1 g „	15	0 „ „	ca. 1,6*)	

*) Durchschnitt von drei Analysen.

Die Versuche zeigen, daß sich auch Arsenmengen von wenigen µg quantitativ nach dem gegebenen Verfahren überdestillieren lassen. Da bei diesen Versuchen noch nicht die oben beschriebenen gereinigten Reagenzien benutzt wurden, wurde der Arsengehalt im Blindwert der Reagenzien bestimmt und in Rechnung gesetzt.

Daß ein Überspritzen der Destillierflüssigkeit bei Anwendung eines Destillierkolbens mit niedrig angesetztem Ableitungsrohr nicht in Frage kommt, wurde durch folgende Versuche bewiesen:

Das Arsensäurereagens trübt, wie schon früher erwähnt wurde, sehr empfindlich mit Phosphaten. Es wurden deshalb mehrere Destillationen ausgeführt, bei denen außer einer bestimmten Menge Arsensäure ein *großer Überschuß Phosphatlösung (10 bis 15 ccm einer etwa 10%igen NaH_2PO_4-Lösung)* im Destillationskolben vorhanden war. Das Ergebnis war folgendes:

Tabelle III.

Zugesetzte Menge H_3AsO_4 . . . . µg	500	250	50	10	blind
Gefundene „ „ + Blindwert . „	503,0	256,5	52,35	10,4	1,8 *)
„ „ „ . . . . „	501,2	254,7	50,55	8,6	

*) Durchschnitt von drei Analysen.

Die Anwesenheit von Phosphorverbindungen in der Veraschungslösung ist also ohne jede Bedeutung, da die Trennung vom Arsen durch die Destillation quantitativ ist.

Die als Norm angewandten 2 g KCl (+ 0,2 g KBr) (bei dieser Berechnung des Kochsalzgehalts kann der Zusatz von 0,2 g KBr vernachlässigt werden) entwickeln theoretisch 0,98 g Chlorwasserstoffgas, und dieses bindet 1,07 g NaOH. Bei einer Destillation mit der obigen Chlorkaliummenge genügt also die Vorlage von 30 ccm n/1 NaOH, um die theoretisch mögliche Menge HCl zu binden. 30 ccm n/1 Natron-

lauge, das sind 1,2 g NaOH ergeben neutralisiert 1,75 g NaCl. Diese in der Vorlage vorhandene Salzmenge gestattet, das Gesamtdestillat auf 15 ccm einzuengen, ohne die nach den Vorschriften der Methode zulässige Doppeltnormalität an Chlornatrium in der Untersuchungslösung zu überschreiten. Da 8 ccm dieses Untersuchungsvolumens zur Messung gelangen und 0,005 mg H_3AsO_4 in dieser Einheit den untersten Wert in der Makromethodik darstellt, können also Mengen bis zu 0,01 mg = 10 μg H_3AsO_4 mit einer Menge von 2 g Kaliumchlorid destilliert werden. Es ist nun möglich, daß eine Veraschungslösung, die unter Zusatz von 2 g KCl + 0,2 g KBr destilliert, und deren Destillat nach der Oxydation und Neutralisation auf 15 ccm eingedampft worden ist, geringere Arsenmengen enthält. Um diese geringen Mengen zu messen, ist es notwendig, eine Parallelveraschung unter Anwendung von 0,4 bis 0,5 g KCl und einer Spur KBr zu destillieren, die dann nach Tabelle IV völlig ausreichen.

Tabelle IV.

Angewandte Mengen KCl + KBr	Vorgelegte Menge n/1 NaOH ccm	Zugesetzte Menge H_3AsO_4	Gefundene Menge H_3AsO_4 μg
0,5 g KCl + Spur KBr	7,5	0,0075 mg = 7,5 μg	8,3
0,5 g „ + „ „	7,5	0,005 „ = 5 „	6,3
0,4 g „ + „ „	6	0,005 „ = 5 „	6,5
0,4 g „ + „ „	6	0,003 „ = 3 „	3,4
0,4 g „ + „ „	6	blind	1,1
0,5 g „ + „ „	7,5	„	1,0

Bei diesen Messungen von Arsenmengen unter 10 μg Arsensäure wird das Destillat nach der üblichen Behandlung in einer kleinen Porzellanschale oder besser in einem kleinen Platingefäß auf 3 ccm eingeengt. Mittels einer Mikropipette entnimmt man 2 ccm davon, setzt 1,6 ccm Reagens hinzu und ist dann in der Lage, gegen eine entsprechende Vergleichslösung mit der Mikroapparatur des Nephelometers Messungen bis herunter zu 0,001 mg H_3AsO_4 = etwa 0,0005 mg As vorzunehmen. Unter diesen Umständen bleiben alle Bedingungen zur Messung gewahrt.

β) Oxydation und Aufarbeitung.

Es wurde ursprünglich versucht, um einen Salzgehalt des Destillats zu vermeiden, nur destilliertes Wasser vorzulegen, das überdestillierte $AsCl_3$ in der salzsauren Lösung zu fünfwertigem Arsen zu oxydieren und dann die Salzsäure abzurauchen. Dies gelang nicht. Sowohl Oxydationsversuche mit Bromwasser als auch mehrstündiges Stehen des Destillats in geschlossener Flasche mit ¼ Volumen konzentrierter Salpetersäure führten nach vorsichtigem Adbampfen der Säuren auf

dem Wasserbad zu Arsenverlusten. Nach diesen Versuchen war es unbedingt notwendig, die Oxydation bei alkalischer Reaktion des Destillats vorzunehmen. Die Versuche zeigten, daß eine Oxydation dreiwertigen Arsens zu fünfwertigem in schwach alkalischem Milieu mit wenig Perhydrol, *Merck*, quantitativ verläuft. Belegt werden diese Versuche durch Tabelle V.

Tabelle V.

Versuchsmenge As_2O_3 . . . μg	50	100	20	20	30	25	10	10	8	5
Wiedergef. Menge H_3AsO_4 „	72,0	141,0	30	28,5	44,5	36,0	13,5	14,5	11,0	ca. 7
Theoretische „ „ „	71,6	141,3*)	28,7		43,0	36,0	14,3		11,5	7,1

*) Lösung flockte bereits.

Hieraus ergab sich folgendes Verfahren zur Herstellung der Vorlage und Aufarbeitung des Destillats. Für jedes bei der Destillation verwendete Gramm Kaliumchlorid werden 15 ccm n/1 Natronlauge in das Reagensrohr der Vorlage eingefüllt. Es wird so viel destilliertes Wasser zugegeben, daß das Rohr *r* (s. Abb. 1) gut in die Vorlageflüssigkeit eintaucht.

Nach beendigter Destillation wird die Verbindung zwischen Kühler und Vorlage gelöst, der Kühler (mit Ableitungsrohr) wird sorgfältig mit destilliertem Wasser in eine mindestens 200 ccm fassende Porzellanschale abgespült, die Vorlage wird auseinandergenommen, die Vorlageflüssigkeit ebenfalls hinzugegeben, desgleichen werden die Spülwässer von den beiden Teilen der Vorlage (Reagensglas mit Ansatzrohr und Saugflasche) mit dem Gesamtdestillat in der Porzellanschale vereinigt.

Dieses Gesamtdestillat soll nach der Destillation noch deutlich lackmus-alkalisch sein. Ist dies nicht der Fall, so ist erstens möglich, daß nicht genügend n/1 NaOH vorgelegt worden ist; zweitens besteht aber auch noch die Möglichkeit, daß bei übermäßig langer Dauer der Destillation durch das Ferrosulfat eine teilweise Reduktion der Schwefelsäure zu schwefliger Säure stattgefunden hat, die dann mit übergegangen ist. Ein Schaden entsteht hierdurch nicht; das Destillat muß aber sofort durch ein paar Tropfen n/1 Lauge alkalisch gemacht werden. Das gesamte Arsen befindet sich dann als arsenige Säure bzw. Natriumarsenit in Lösung. Hierauf gibt man zu dem alkalischen Destillat etwa 10 Tropfen Perhydrol, *Merck*, und erwärmt die Porzellanschale auf einem Wasserbad. Es wird mit dem Eindampfen der Lösung fortgefahren, bis ein Volumen erreicht ist, welches schätzungsweise kleiner ist als das, auf welches man die zu messende Lösung aufzufüllen wünscht. Hiermit ist die Oxydation beendet. Die Schale wird von dem Wasserbad entfernt und 1 Tropfen Phenolphthalein zugesetzt. Die Neutralisation wird mit verdünnter forensischer Salzsäure vorgenommen;

der Zusatz weniger Tropfen genügt, um den Umschlag herbeizuführen. Die Schale wird wieder kurze Zeit auf das noch warme (nicht mehr erhitzte!) Wasserbad gestellt (bei starkem Erhitzen kann Arsenverlust eintreten), die rote Farbe wird nochmals auftauchen, nachdem die immer einsetzende, gelinde Kohlensäureentwicklung vorüber ist. Jetzt genügen weitere 1 bis 2 Tropfen der Säure zur vollständigen Neutralisation. Es ist darauf zu achten, daß die Neutralisation nur in der Wärme, nicht in der Hitze vorgenommen wird. Ein Filtrieren dieser Lösung ist nicht notwendig, wenn man sie auf 50 oder 100 ccm auffüllt. Von einem geringen Bodensatz (Silikate aus den Laugen) kann abgehoben werden. Bei gröberen Verunreinigungen, speziell wenn man das Gesamtdestillat auf 10 ccm eingedampft hat, ist es erforderlich, die Flüssigkeit durch ein Glasfilter (*Schott*, Jena), welches man vorher in wenig forensische Salzlösung gelegt und mit destilliertem Wasser gut abgespült hat, in das Meßgefäß zu filtrieren und mit wenigen Tropfen aqua dest. nachzuspülen. Nach dem Auffüllen auf ein bestimmtes Volumen ist die Lösung zur Messung fertig.

c) Versuche an Veraschungslösungen mit nachträglich zugesetztem Arsen.

Es mußte noch festgestellt werden, ob die bei der Veraschung angewandten Reagenzien bzw. die aus den veraschten Organen entstehenden Substanzen einen Einfluß auf die Schneiderdestillation ausüben.

Zu diesem Zwecke wurden mehrere Male je 20 g Trockenpulver, wie oben beschrieben, verascht; zu den Aschenlösungen wurden je 100, 60, 25 usf. μg H_3AsO_4 gegeben und nach der oben angegebenen Methode der Destillation unterworfen. Außerdem wurden zwei Blindbestimmungen mit je 20 g des sorgfältigst gemischten Lebertrockenpulvers und der gleichen Menge angewandter Reagenzien ausgeführt.

Es ist — und dies gilt als allgemeine Vorschrift — notwendig, die in der Veraschungslösung möglicherweise noch vorhandene, unverbrauchte Salpetersäure, sowie die durch die Verbrennung entstandene Nitrosylschwefelsäure vollständig zu entfernen. Ersteres geschieht durch etwa 15 Minuten lang anhaltendes Kochen der Lösung; die Nitrosylschwefelsäure wird am besten in der Weise zerstört, daß man zu dem Kolbeninhalt 20 bis 30 ccm destilliertes Wasser fügt und dann wieder verkocht. Durch eintretende Hydrolyse wird die Zersetzung bewirkt, der Kolben füllt sich mit nitrosen Gasen, die dann entweichen. Es ist ratsam, diese letzte Prozedur zweimal auszuführen, um genügend Gewähr für restlose Entfernung der Nitrosylschwefelsäure zu haben, da sie später bei der weiteren Verarbeitung stört.

Tabelle VI.

Angewandte Arsenmenge . . . . . . μg H_3AsO_4	100	60	25	10
Gefundene " . . . . . " "	106,5	64,0	29,2	14,5
Abzüglich Blindwert (ca. 4,5 μg) . . " "	102,0	59,5	24,7	10,0

Die Versuche zeigen, daß in Gegenwart sämtlicher zur Veraschung dienender Reagenzien, sowie der Asche selbst Arsenmengen im Gebiete der Methode exakt wiedergefunden werden können.

III. Durchführung von Veraschung und Isolierung.

Zur Bestätigung der in den einzelnen Teilen des Arbeitsganges erprobten Verfahren wurden nunmehr Gesamtanalysen in der Weise ausgeführt, daß zu verschiedenen Materialien, wie Organpulver, Blut, Harn, Traubenzucker, Papier und Metalle, variierte Mengen Arsensäure in Mengen von 100 bis 2 μg H_3AsO_4 = etwa 50 bis 1 μg Arsen zugesetzt wurden. Diese Substanzen wurden dann auf Arsen analysiert.

Tabelle VII.

Verbrannte Menge Substanz	Zugesetzte Menge H_3AsO_4 μg	Gefund. Menge Arsensäure a) insgesamt μg	Gefund. Menge Arsensäure b) nach Abzug des Blindwertes μg	Fehlerberechnung
10 g Traubenzucker . . .	0 (blind)	6,3	—	
	10	15,8	9,5	— 5 %
	50	56,0	49,7	— 0,6 %
	100	109,0	102,7	+ 2,7 %
165 ccm Harn	0 (blind)	ca. 0,8	—	
	10	10,6	9,8	— 2 %
	60	58,8	58,0	— 3,3 %
15 g getrocknete Ovarien	(blind)	ca. 1,0	—	
	50	51,0	50,0	0 %
	100	103,5	102,5	+ 2,5 %
5,5 g Papier	0 (blind)	ca. 0,5	—	
	15	14,75	14,25	— 5 %
	75	76,5	76,0	+ 1,3 %
70 ccm Blut	0 (blind)	30,0	—	
	45	75,0	45,0	0 %
	90	124,4	94,4	+ 4,9 %
5,5 g Zink	0 (blind)	2,3	—	
	10	10,4	8,1	1,9 μg
	50	52,0	49,7	— 0,6 %
4 g Traubenzucker (reinstes Präparat)	0 (blind)	ca. 0,9	—	
	2	3,9	3,0	1,0 μg
	5	7,4	6,5	1,5 "
20 g getrocknete Leber .	(blind)	5,8	—	
	100 μg As_2O_3 = 143 μg H_3AsO_4	151,0	145,2	+ 1,5 %

Daneben wurden gleich große Substanzmengen ohne Arsenzusätze analysiert, also ihre Blindwerte festgestellt. Alle Bestimmungen einer Gruppe der folgenden Tabelle VII wurden vollständig gleichartig behandelt, d. h. es wurden bei jeder Verbrennung dieselben Säure- und bei jeder Destillation usw. dieselben Mengen der erforderlichen Reagenzien angewendet. Zur Kontrolle wurde auch ein Versuch mit Organtrockenpulver unter Zusatz dreiwertigen Arsens zum Material ausgeführt. Auch ein Versuch mit Metall (Zink) wird gegeben.

Wie die Tabelle VII zeigt, bestätigt die Gesamtanalytik die Teilergebnisse der Arbeit; stets wurden alle zugesetzten Arsenmengen exakt innerhalb der Fehlergrenzen der Methode wiedergefunden. Dieser Fehler beträgt bei den Gesamtmethoden bis zu Mengen von 10 μg H_3AsO_4 (etwa 5 μg As) hinab: 2 bis 3%. Unter 10 μg H_3AsO_4, wo die Trübungen schon sehr schwach werden und größere Übung bei der Messung erforderlich ist, kann der Fehler der Gesamtmethodik größer werden (etwa 5%). Bei den kleinsten Arsenmengen unter 5 μg H_3AsO_4 (etwa 2,5 μg As), deren Messung in das Gebiet der Mikromethodik fällt, schwankt die Messung um etwa $\pm$ 0,75 μg Arsen.

Zusammenfassung des Methodenganges.

Es sei zum Schluß noch einmal das Prinzip des ausgearbeiteten Methodenganges zusammenfassend dargestellt:

Das zerkleinerte und, wenn feucht oder flüssig, auf dem Wasserbad zur Trockne gebrachte Untersuchungsmaterial (stark NaCl-haltiges, sauer reagierendes Material wird nach Alkalisierung getrocknet) wird zu einem möglichst feinen Pulver zermahlen oder zerrieben. Anorganische Materialien, z. B. Metalle werden mit verdünnter rauchender Salpetersäure unter Vorschaltung von Brom (wie S. 51 unter 1., b) behandelt, oder je nach der Art des Untersuchungsmaterials, wenn angängig, direkt der Schneiderdestillation unterworfen. Organische Materialien, wie Leichenteile, Organ, Blut usw. werden zuerst verascht.

Hierzu kommen bis zu etwa 20 g des Organtrockenpulvers in einen 300 ccm fassenden Kjeldahlkolben, wo sie in der Kälte mit einer abgemessenen Menge rauchender Salpetersäure in kurzer Zeit in Lösung gebracht werden. Alle zur Veraschung und Weiterverarbeitung dienenden Reagenzien sind nach der oben beschriebenen Methode auf Grund der Flüchtigkeit des Arsentrichlorids von Arsenspuren zu reinigen. Zu der salpetersauren Lösung wird nach Abkühlung eine gemessene Menge konzentrierter Schwefelsäure und $CuSO_4$ zugegeben, worauf unter tropfenweiser Zufügung von rauchender Salpetersäure unter ganz langsamem Erwärmen die Veraschung vorgenommen wird. Bei Beobachtung der auf S. 48 bis 51 genau dargestellten Technik gelingt es bei diesem Vorgehen, die Veraschung so zu leiten, daß sich nitrose

Gase nur langsam entwickeln, daß keine Verkohlung eintritt und daß die Veraschung vollkommen ohne den geringsten Arsenverlust verläuft. Der Prozeß erfordert in der ersten Stunde dauernde Bearbeitung, läßt sich dann aber bei nur gelegentlicher Beaufsichtigung zu Ende führen und läßt gut Ausführung von Reihenversuchen zu. Eine Menge von 20 g Organtrockenpulver bedarf zur völligen Veraschung etwa 7 bis 8 Stunden. Eine Beschleunigung des Prozesses führt zu Arsenverlusten. Reste von Salpetersäure und Nitrosylschwefelsäure müssen nach der Veraschung durch mehrmaliges Aufkochen mit Wasser beseitigt werden.

Das erkaltete Veraschungsgemisch wird — zweckmäßig am zweiten Arbeitstage — der Schneiderdestillation, d. h. der Abdestillation des Arsens als $AsCl_3$ unterworfen.

In einer (S. 52) genau beschriebenen Destillationsapparatur mit Sicherheitsvorlage werden unter Zusatz von $FeSO_4$, KCl und KBr auch die geringsten Spuren abdestilliert und in einer Vorlage von n/1 NaOH quantitativ aufgefangen. Die genau zu beachtende Technik ist angegeben. In dem alkalischen Destillat wird das dreiwertige Arsen durch einige Tropfen Perhydrol zu fünfwertigem Arsen oxydiert, worauf die Lösung in der Wärme schwach phenolphthaleinsauer gemacht, eingeengt und eventuell durch ein Glasfilter (*Schott*, Jena) filtriert wird. Von der auf ein bestimmtes Volumen gebrachten Lösung dient ein aliquoter Teil zur nephelometrischen Bestimmung.

Diese beruht auf der Anwendung eines neuen Cocain-Salzsäure-Molybdatreagenses (1 Vol.-Teil 1%ige Kaliummolybdatlösung + 2 Vol. Teile n/1 HCl + 1 Vol.-Teil 2%ige Cocainlösung) zur Erzielung nephelometrisch geeigneter Arsensäuretrübungen. Das Reagens wird zu einem gleichen Volumen der Untersuchungslösung gegeben, wobei zur gleichen Zeit Lösungen von Arsensäure bekannter Konzentration (Standardlösungen) angesetzt werden. Die exakte Trübungsmessung erfolgt nach einer bestimmten Zeit mit dem Nephelometer nach *Kleinmann*[1]). Die Methode gestattet Arsenbestimmungen zwischen 60 und 0,5 μg Arsen. Die Verarbeitung der Veraschungslösung bis zur Messung erfordert etwa 3 Stunden. Der Fehler der Gesamtmethode bis zu Mengen von 5 μg As beträgt 2 bis 3%, unterhalb dieser Menge steigt er etwas an.

Zusammenfassung.

Die neue nephelometrische Arsenbestimmungsform machte die Ausarbeitung einer geeigneten Veraschungs- und Eliminierungsart des Arsens aus organischen Materialien notwendig. Die experimentelle

[1]) Dasselbe wird von der Firma Schmidt und Haensch, Berlin S 42, Prinzessinnenstr. 16, hergestellt.

Prüfung der bestehenden Methoden schließt die Anwendung von trockener Veraschung, Oxydationsschmelze und Veraschung mit oxydierenden Salzen aus und zeigt die Eignung einer reinen Säuregemischveraschung.

Ein Verfahren zur bequemen Reinigung aller angewandten Reagenzien von Arsenspuren auf Grund ihrer Entfernung als $AsCl_3$ wird gegeben. Es wird eine Technik des Veraschungsprozesses ermittelt, die gestattet, die Veraschung vollständig und ohne Arsenverlust zu leiten.

Die Technik der Arsentrichloriddestillation wird für kleinste Arsenmengen geprüft und entsprechend geändert. Eine bestimmte Apparatur wird angegeben und die quantitative Durchführung der Destillation an reinen Arsenlösungen dargestellt.

Die geeignete Aufarbeitung des Destillats für die nephelometrische Bestimmung wird untersucht und in der alkalischen Oxydation des dreiwertiges Arsen enthaltenden Destillats mittels Perhydrol gefunden. Eine bestimmte Technik der Destillataufarbeitung wird gegeben.

Des weiteren wird festgestellt, daß auch die Zugabe von Aschenlösungen die Destillationstechnik nicht beeinflußt. Es werden Gesamtanalysen der verschiedenartigsten Materialien nach Zugabe bekannter Arsenmengen durchgeführt. Die Analysen (von Organ, Blut, Harn, Tapete, Zucker, Zink) zeigen, daß bis herunter zu 0,5 μg Arsen der ermittelte Gesamtmethodengang eine einwandfreie und relativ einfache Analysenform darstellt.

Zur Methodik der Bestimmung des Blutkatalasegehalts.

Von

P. J. Golzow und W. D. Jankowsky.

(Aus dem hygienischen Centrallaboratorium der Militär-Sanitätsverwaltung in Moskau.)

(Eingegangen am 14. März 1927.)

Die vorliegende Abhandlung erhebt keinen Anspruch auf vollkommene Klärung der angeschnittenen Frage. Es sollen nur einige experimentelle Ergebnisse mitgeteilt werden, die ein gewisses Interesse für diejenigen bieten dürften, die sich mit dem Studium der Katalase beschäftigen.

Das Ziel unserer Untersuchungen war, festzustellen, inwieweit der Gehalt an Katalase von der Dauer des Aufbewahrens eines geschlachteten Rindes — in gefrorenem oder ungefrorenem Zustande — abhängt. Es war daher erforderlich, dieses oder jenes Verfahren zur Bestimmung der Katalase auszuwählen. Da wir uns zur Auffindung der erwähnten Beziehung des Blutkoagulums bedienen wollten, das nach dem Schlachten des Tieres in den großen Adern zurückbleibt, trachteten wir danach, aus der uns zugänglichen Literatur eine für die Katalase des Blutes geeignete Bestimmung herauszufinden.

Wir entschieden uns für die recht verbreitete Permanganatmethode von *A. Bach* und *L. Subkowa*, da sie sich sehr einfach, praktisch und bequem ausführen läßt und selbst für ein ungenügend eingerichtetes Laboratorium zugänglich ist.

Das betreffende Verfahren ist in dieser Zeitschr. **125**, 284, 1922, veröffentlicht worden. „1 ccm Blutlösung (1 : 1000), 7 ccm Wasser und 2 ccm 1 % reinen Wasserstoffsuperoxyds (*Merck*) werden in einen 75 ccm fassenden Erlenmeyerkolben gebracht, die Mischung 30 Minuten im Thermostaten bei 37° stehengelassen und alsdann nach dem Ansäuern mit 3 ccm 10 % Schwefelsäure das unzersetzte H_2O_2 mittels n/10 Permanganatlösung in der üblichen Weise bestimmt".

Um größere Gewißheit über die Richtigkeit der Ergebnisse, die bei Anwendung der Permanganatmethode von *Bach* und *Subkowa* erhalten werden, zu erlangen, führten wir gleichzeitig auch Bestimmungen

des Katalasegehalts im Blute nach der gasometrischen Methode (*Battelli* und *Stern*) aus. Ferner hielten wir es für angebracht, beim *Bach*schen Verfahren eine verdünnte Lösung von Äthylalkohol hinzuzusetzen, um die unter dem Einfluß der Antikatalase erfolgende Inaktivierung der Katalase aufzuheben, worauf bereits *E. Gagarina* in ihrer Arbeit hinweist.

Bevor wir mit der Beschreibung unserer diesbezüglichen Versuche beginnen, wollen wir auf folgendes hinweisen: In der jüngsten Literatur existiert eine Anzahl von Vorschriften, bei der Katalasebestimmung einen Überschuß von Wasserstoffsuperoxyd (bestimmter Konzentration) anzuwenden. Die Berechnung ist derart, daß bei Beendigung der Reaktion ungefähr die Hälfte oder sogar mehr als die Hälfte des von der Katalase nicht zersetzten H_2O_2 noch vorhanden sein muß.

Von diesem Standpunkt aus betrachtet ist ersichtlich, daß die Permanganatmethode von *Bach* und *Subkowa* dieser wesentlichen Bedingung zur Erhaltung einwandfreier Resultate nicht genügt. Es wird für die Reaktion viel zu wenig H_2O_2 verwendet (2 ccm 1 % H_2O_2 enthalten überhaupt nur 20 mg Wasserstoffsuperoxyd). Diese Menge wird im Verlauf von 30 Minuten von dem Ferment, das sich in 0,01 ccm Blut befindet, fast ganz zerlegt, daher kann in diesem Falle die Katalase des Blutes nicht in vollem Umfange aufgefunden werden.

Bach und *Subkowa* haben bereits festgestellt, daß durch 0,01 ccm Blut von dem Aussehen nach gesunden Menschen während 30 Minuten durchschnittlich 14 bis 18 mg H_2O_2 zerlegt werden. Diese Beobachtung konnte auch von anderen Autoren, die sich des gleichen Verfahrens bedienten (*Iwanitzky-Wassilenko*, *Alexeeff* u. a.), bestätigt werden. Bei Beendigung der Reaktion bleiben also insgesamt 2 bis 6 mg H_2O_2 anstatt 10 mg (s. oben) unzerlegt. Es ist anzunehmen, daß bei erhöhtem Katalasegehalt im Blute das Hydroperoxyd unter diesen Bedingungen fast ganz oder sogar völlig gespalten wird.

Unsere Versuche, die den Einfluß der zur Reaktion angewandten H_2O_2-Menge auf den Katalaseindex (nach *Bach* und *Subkowa*) ermitteln sollten, wobei es sich um Blut dem Aussehen nach gesunder Menschen handelte, zeigen deutlich, daß die Quantität des Wasserstoffsuperoxyds, die von *Bach* und *Subkowa*, sowie auch von einigen anderen russischen Forschern verwendet wurde, zur Bestimmung der Blutkatalase nicht ausreichte.

Bei der Ausführung unserer Versuche hielten wir uns genau an die Vorschriften von *Bach* und *Subkowa*. Es variierte nur die Menge des 1 % H_2O_2 und des Wassers, die zu jeder Katalasebestimmung genommen wurden. Die Konzentration der Schwefelsäure betrug nicht 10 %, sondern 20 %, um bei der Titration des von dem Enzym nicht zersetzten H_2O_2 mit $KMnO_4$ bei Beendigung der Reaktion einen Überschuß an

Schwefelsäure zu erhalten. Die Ergebnisse der Versuche sind in der folgenden Tabelle I wiedergegeben. Die Ziffern bedeuten, wie auch in allen anderen Tabellen, die Menge H_2O_2 in Milligrammen, die von 0,001 ccm Blut bei 17° während 30 Minuten zerlegt worden sind. (Katalaseanzeiger.)

Tabelle I.

Nr.	Bestimmungen							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	2 ccm 1% H_2O_2 (20 mg). 7 ccm Wasser, 1 ccm Blutlösg.	3 ccm 1% H_2O_2 (30 mg). 6 ccm Wasser, 1 ccm Blutlösg.	4 ccm 1% H_2O_2 (40 mg). 5 ccm Wasser, 1 ccm Blutlösg.	5 ccm 1% H_2O_2 (50 mg). 4 ccm Wasser, 1 ccm Blutlösg.	6 ccm 1% H_2O_2 (60 mg). 3 ccm Wasser, 1 ccm Blutlösg.	7 ccm 1% H_2O_2 (70 mg). 2 ccm Wasser, 1 ccm Blutlösg.	8 ccm 1% H_2O_2 (80 mg). 1 ccm Wasser, 1 ccm Blutlösg.	9 ccm 1% H_2O_2 (90 mg). 1 ccm Blutlösg.
1	17,9	26,3	30,6	31,8	32,8	30,5	30,6	29,1
2	18,2	25,4	28,9	29,3	31,7	28.1	28,0	27,4
3	19,1	29,3	31,3	33,0	33,0	33,0	32,9	30,4
4	19,3	22,9	24,2	24,3	25,1	24,2	23,1	22,8
5	17,1	23,6	23,9	26,7	27,4	26,2	26,3	25,4
6	17,1	25,2	27,7	27,1	26,4	25,7	24,0	23,3
7	19,0	19,0	23,1	23,7	24,0	22,6	22,4	21,9
8	18,2	22,1	22,9	23,6	23,8	22,7	22,5	21,8
9	16,7	21,5	23,1	23,4	23,6	23,4	22,9	21,7
10	18,1	22,2	24,1	25,2	25,7	25,1	24,2	23,1

Aus der Tabelle I ist folgendes ersichtlich: Die Erhöhung der zur Katalasebestimmung angewandten H_2O_2-Menge um etwa 30 mg hat oft eine gesteigerte H_2O_2-Zersetzung zur Folge. Die maximale Spaltung des Wasserstoffsuperoxyds durch die Katalase erfolgt in 0,4 bis 0,6% Lösung (Kölbchen Nr. 3 und 5). Bei Beendigung der Reaktion bleibt eine beträchtliche Menge H_2O_2 unzerlegt, obwohl die Katalase manchmal (Nr. 1 bis 3) mehr als die Hälfte des angewandten Hydroperoxyds spaltet. Der erwähnte Übelstand läßt sich durch weiteren Zusatz 0,5% H_2O_2 nicht beseitigen, weil dann das Volumen der zum Versuch verwandten Reagenzien 10 ccm übersteigen würde. Die Katalase wäre daher zu stark verdünnt und könnte somit auf das Resultat des Versuchs einwirken. Zu bemerken ist, daß die aus Blutlösungen 1 : 10000 bereitete Katalaselösung anscheinend sehr verdünnt sein muß und daß die hydrolytische Spaltung der Katalasemoleküle für das Ergebnis des Versuchs schädliche Folgen zeitigt.

Nachdem die Abhängigkeit der Blutkatalase von der Quantität und der Konzentration des verwendeten Hydroperoxyds festgestellt worden war, wurden gleichzeitig einige vergleichende Katalasebestimmungen im Blute eines und desselben Menschen sowohl nach dem Verfahren von *Bach* und *Subkowa*, und zwar mit verschiedenen Quantitäten H_2O_2 als auch nach der gasometrischen Methode ausgeführt.

Aus Tabelle II geht hervor, daß bei sonst gleichen Bedingungen die gasometrische Bestimmung etwas niedrigere Werte für das durch die Katalase zerlegte Wasserstoffsuperoxyd gibt, wobei das in zu geringer Menge verwandte H_2O_2 keinen großen Einfluß auf das Resultat des Versuchs hat.

Tabelle II.

Methode	Bestimmungen			
	1	2	3	4
	2 ccm 1% H_2O_2, 7 ccm H_2O, 1 ccm Blutlösg.	3 ccm 1% H_2O_2, 6 ccm H_2O, 1 ccm Blutlösg.	4 ccm 1% H_2O_2, 5 ccm H_2O, 1 ccm Blutlösg.	5 ccm 1% H_2O_2, 4 ccm H_2O, 1 ccm Blutlösg.
Permanganat-methode . . .	18,8	25,2	31,4	32,8
Gasometr. Methode	19,7	25,9	31,2	32,1

Die in Tabelle II angeführten Ziffern stellen Durchschnittszahlen dar aus vier Katalasebestimmungen im Blute ein und derselben Person, das an verschiedenen Tagen gewonnen worden war.

Da man bei der Bestimmung der Katalasemenge nach beiden Methoden fast übereinstimmende Werte erhält, wenn bei dem Permanganatverfahren die zur Reaktion ausreichende Quantität H_2O_2 (4 bis 6 ccm 1% Lösung) verwendet wird, entschieden wir uns für die einfachere und uns mehr zugängliche Permanganatmethode. In der Folge führten wir jede Katalasebestimmung in drei Kolben aus, und zwar mit verschiedenen H_2O_2-Mengen (4,5 und 6 ccm 1% Lösung), je nachdem die Konzentration für den Versuch selbst am vorteilhaftesten war.

Wie bereits erwähnt, gingen wir im Verlauf unserer weiteren Beschäftigung mit der Permanganatmethode von *Bach* und *Subkowa* daran, zu der Blutlösung eine geringe Menge Äthylalkohol hinzuzusetzen. Angewandt wurden 0,08 ccm einer 8% Alkohollösung auf 20 ccm Blutlösung (vgl. auch die Mitteilung von *Gagarina*). Es sollte dadurch die Inaktivierung der Katalase verhindert werden, die anscheinend unter dem Einfluß der Antikatalase beim Stehenlassen ziemlich stark verdünnter Blutlösungen erfolgt. Zu diesem Zwecke wurde folgende Versuchsreihe angesetzt (das Blut wurde jedesmal aus ein und demselben Tropfen genommen): 20 cmm Blut wurden in einem Reagenzglas mit 20 ccm Wasser (erste Lösung) zusammengebracht; die gleiche Blutmenge wurde in einem Reagenzglas in 20 ccm Äthylalkohol gelöst, Verdünnung 1 : 5000 (zweite Lösung). Zu 10 ccm der ersten Blutlösung wurden 0,04 ccm Äthylalkohol (Verdünnung 1 : 20) hinzugefügt, darauf wurden 5 ccm dieser Lösung sowie auch 5 ccm der zweiten Blutlösung in Glasröhren auf 30 Minuten in ein Wasserbad

von 37° gestellt, die anderen Röhrchen blieben bei Zimmertemperatur von 17 bis 18° stehen. Nach Verlauf einer halben Stunde wurden gleichzeitig die Bestimmungen des Katalasegehalts in allen Blutlösungen ausgeführt.

Versuch 1. Die Bestimmung der Blutkatalase in wässeriger Lösung, bevor die Blutlösung in das Wasserbad von 37° gebracht worden ist.

Versuch 2. Wie Versuch 1, nur ist zur Blutlösung Alkohol hinzugefügt worden.

Versuch 3. Wie Versuch 2, zur Blutlösung Zusatz von Alkohol und auf 30 Minuten ins Wasserbad von 37° gestellt.

Versuch 4. Bestimmung der Blutkatalase in der Lösung mit Äthylalkohol, bevor die Probe ins Wasserbad von 37° gesetzt worden ist.

Versuch 5. Wie Versuch 4, die Blutlösung ist auf 30 Minuten ins Wasserbad von 37° gestellt worden.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle III wiedergegeben worden.

Tabelle III.

Bestimmungen.

Nr.	Bestimmungen				
	1	2	3	4	5
	Blut in wässeriger Lösung	Blut in wässer. Lösung, nachher Alkohol hinzugefügt u. 30′ ins Wasserbad von 17° gestellt	Dasselbe, 30′ ins Wasserbad von 37° gestellt	Blut in Alkohollösung 1 : 5000	Dasselbe, 30′ ins Wasserbad von 37° gestellt
1	30,3	—	—	—	27,3
2	21,7	—	23,0	—	23,0
3	24,6	29,6	29,0	27,5	26,8
4	24,4	29,4	29,0	27,5	26,2
5	15,3	17,2	16,7	17,2	16,3
6	22,5	24,8	24,2	22,0	21,8
7	20,9	21,9	21,8	24,2	21,7
8	17,1	19,2	18,9	18,8	19,2
9	19,4	22,7	21,1	22,1	21,3
10	24,7	26,7	27,5	27,1	25,9
11	24,6	24,8	25,8	25,0	25,0
12	21,1	21,3	23,4	22,3	21,7
13	25,3	28.3	28,1	27,9	25,8

Aus dieser Tabelle geht folgendes hervor: Bringt man Blut in eine verdünnte Äthylalkohollösung (1 : 5000), oder setzt man Alkohol zu der entsprechend verdünnten Blutlösung hinzu, so kann man zum größten Teil die Inaktivierung der Katalase beim Stehen von verdünnten Blutlösungen verhindern. Dieser Befund wurde bereits von *Battelli* und *Stern* sowie *Gagarina* erhoben. Die Reaktivierung der Katalase beginnt nach dem Zusatz von Alkohol zur Blutlösung während 30 Minuten,

selbst bei einer Temperatur von 17°. Es ist daher nicht erforderlich, die Blutlösung nach der Alkoholbeigabe in den Thermostaten bei 37° zu stellen, um so weniger, als sich sehr oft die katalatische Kraft derartiger Blutlösungen, die eine halbe Stunde im Brutschrank bei 37° gestanden haben, etwas vermindert. Dies ist besonders der Fall bei denjenigen Blutlösungen, die augenblicklich mit Alkohol versetzt worden sind. Zum Vergleich mögen die Bestimmungen 2 und 3, und ebenso 4 und 5 in der Tabelle III dienen.

Bevor wir unsere Ergebnisse zusammenfassen, wollen wir noch folgendes bemerken: Der Hauptteil der zahlreichen Untersuchungen über den Blutkatalasegehalt gesunder und kranker Menschen und Tiere, die von russischen Autoren (*Bach, Subkowa, Wassiliewa-Anwelt, Eliwarowa, Iwanitzky-Wassilenko, Kogan, Timofejewa* u. a.) angestellt wurden, kann nicht in vollem Umfange als beweisend angesehen werden. Da die Versuche nach der ursprünglichen Methode von *Bach* und *Subkowa*, oder mit geringen Variationen ausgeführt wurden, ohne jedoch die zur Reaktion verwandte H_2O_2-Menge zu erhöhen, waren in einer großen Anzahl von Fällen, in denen der Katalaseindex höher als 10 bestimmt wurde, die wirklichen Katalasewerte (Katalasezahl) bedeutend höher und ihre Schwankungsbreite größer, als in den angeführten Arbeiten angegeben war.

Zum Schlusse halten wir es noch für notwendig, anzugeben, daß die von uns erhaltenen Katalasewerte bei dem Aussehen nach gesunden Menschen anscheinend ziemlich oft 25 bis 30 und sogar 33 (Tabelle I) erreichen und nicht übereinstimmen mit den Katalasewerten von *Alexeeff*, der sich zur Bestimmung der Katalase im Blute der veränderten Methode von *Bach* und *Subkowa* bediente, anstatt 2 ccm 1% H_2O_2 verwendete er 5 ccm.

Alexeeff findet im Blute erwachsener Menschen, die in der Ebene leben, einen durchschnittlichen Katalaseindex 17; bei Gebirgsbewohnern einen etwas höheren, im Maximum 26,8, im Minimum 20,2.

Zusammenfassend kommen wir zu folgenden Schlußfolgerungen:

1. Die Permanganatmethode von *Bach* und *Subkowa* kann wegen der unzureichenden Quantität des zur Reaktion verwendeten H_2O_2 in ihrer ursprünglichen Form nicht für alle Fälle der Blutkatalasebestimmung bei Menschen und einigen Tieren benutzt werden.

2. Um einen genaueren Katalaseindex zu erhalten, muß das Verfahren derart modifiziert werden, daß die Menge des zur Reaktion bestimmten H_2O_2 vermehrt wird — anstatt 20 mg, bis zu 40 bis 60 mg Hydroperoxyd.

3. Es ist notwendig, den bei Zimmertemperatur aufbewahrten Blutlösungen ungefähr 30 Minuten vor der Katalasebestimmung eine unbedeutende Quantität von Äthylalkohol (1 : 5000) hinzuzufügen,

um die Katalase, die durch das unvermeidliche Stehenlassen der Blutlösung bis zum Augenblick der Versuchsanstellung inaktiviert ist, zu reaktivieren.

4. Die Ergebnisse und Schlußfolgerungen derjenigen Arbeiten (darunter eine ganze Reihe von russischen Autoren), die mit der ursprünglichen Methode von *Bach* und *Subkowa* ausgeführt wurden, sind mit einem gewissen Vorbehalt aufzunehmen und bedürfen größtenteils einer erneuten Prüfung.

Literatur.

1) *A. Bach* und *L. Subkowa*, diese Zeitschr. **125**, 283, 1922. — 2) *Battelli* und *Stern*, Achivio di Fisiologia **2**, 471, 1905. — 3) *Dieselben*, Journ. de Physiol. et de Pathol. générale **7**, 919, 1905. — 4) *Dieselben*, ebendaselbst **7**, 957, 1905. — 5) *Dieselben*, Soc. Biolog. **68**, 1040, 1910. — 6) *Dieselben*, Die Katalase. Ergebn d. Physiol. **10**, 531, 1910. — 7) *Gagarina*, Ber. ü. d. ges. Physiol. u. experim. Pharmakol. **37**, 193, 1926. — 8) *E. Iwanitzky-Wassilenko* und *A. Bach*, diese Zeitschr. **148**, 469 1924. — 9) *Eliwarowa*, Bulletin Moskauer Gesellsch. d. Naturforsch. **32**, 1924. — 10) *Morgulis*, Die Katalase. Ergebn. d. Physiol. **28**, 308, 1924. — 11) *O. Steppuhn* und *A. Timofejewa*, Arbeiten des chemisch-pharmazeutischen Instituts zu Moskau **8**, 1923. — 12) *Wassiliewa-Anwelt*, Charkow. Wratschebn. Delo, Dezember 1926. — 13) O. *Steppuhn* und *A. Timofejewa*, diese Zeitschr. **136**, 213, 1923.

Über den Einfluß von Monosen und von Magnesiumion auf die Zuckerbildung aus Formaldehyd.

Von

Hans Schmalfuss.

(Nach Versuchen von *Martha Congehl.*)

(Mitteilung aus dem Chemischen Staatsinstitut Hamburg, Universität.)

(Eingegangen am 23. März 1927.)

Durch die Untersuchungen von *K. Kurono* und von *G. Klein* und *O. Werner*[1]) über „Formaldehyd als Zwischenprodukt bei der Kohlensäureassimilation" hat die Bildung von Kohlenhydraten in der Pflanze über den Formaldehyd hinweg neuerdings[2]) einen sehr hohen Grad von Wahrscheinlichkeit erreicht. Auffällig bleibt aber, wie leicht in der Pflanze im Vergleich zum chemischen Experiment Zucker aus Formaldehyd entstehen. Die Pflanze muß also über gewisse Katalysatoren verfügen, die die Kondensation so ungewöhnlich schnell verlaufen lassen.

Sehr einfach ist die Annahme, daß in grünen Pflanzen bei der Formaldehydkondensation Stoffe entstehen, die die Zuckerbildung *katalytisch* fördern. Es gelang uns, im Modellversuch nachzuweisen, daß tatsächlich unter dem Einfluß solcher Stoffe, wie sie in jeder grünen Pflanze vorkommen[3]), die Kondensation von Formaldehyd überraschend schnell durchgeführt werden kann.

Als Modell benutzten wir das System: Formaldehyd—Wasser—Magnesiumoxyd[4]). Denn hierbei beobachteten wir eine besonders auffällige Erscheinung, die auf Katalyse hindeutete.

---

[1]) Diese Zeitschr. **151**, 168, 1924 und **168**, 361, 1926.

[2]) *J. Holluta*, Sammlung chemischer und chemisch-technischer Vorträge 28, 420ff., 1926.

[3]) *Derselbe*, l. c., S. 422.

[4]) Schon *Loew* (B. **21**, 272, 1888; **22**, 471, 1889) hat im Hinblick auf den *Assimilations*vorgang besondere Mühe darauf verwandt, Formaldehyd statt mit anderen Basen mit Hilfe von *Magnesiumverbindungen* (vgl. auch *J. Holluta*, l. c., S. 416, 432) zu Zuckern zu kondensieren. Doch schreibt er selbst: „Magnesia kondensierte bei meinen Versuchen niemals" (B. **39**, 1593, 1926). Hätte er aber die Temperatur nur wenige Grade höher gewählt als 90°, so würde er zum Ziel gekommen sein. Denn wie ich in Gemeinschaft mit *K. Kalle* (B. **57**, 2101, 1924) bei der Fortsetzung unveröffentlichter Versuche von *F. Jorre* zeigte, läßt sich die Kondensation von Formaldehyd bei Gegenwart von Magnesiumoxyd schon bei 100° durchführen. Herrn Dr. *F. Jorre* in Harburg danke ich für sein lebhaftes Interesse und seine umfangreiche materielle Unterstützung.



Kondensiert man Formaldehyd in Gegenwart von Magnesiumoxyd, so bilden sich zunächst nur Methylalkohol und Ameisensäure. Nach einer gewissen Zeit setzt plötzlich Zuckerbildung ein, die dann sehr rasch beendet ist. Hierfür ist ein inzwischen gebildeter Katalysator verantwortlich zu machen[1]).

Um diesen Katalysator zu erkennen und vielleicht durch noch wirksamere Stoffe ersetzen zu können, war es unerläßlich, den Einblick in die gebildeten Produkte zu vertiefen und die Entstehung der aufgefundenen Stoffe zeitlich zu verfolgen.

Auf Grund des so gewonnenen Einblicks setzten wir die gebildeten Stoffe einzeln und kombiniert vor der Kondensation dem System zu und stellten jeweils den Einfluß der zugesetzten Stoffe auf die Kondensationsdauer fest.

Hierbei berücksichtigten wir in erster Linie solche Produkte der Kondensation, wie sie auch in der Pflanze an den Orten der Zuckerbildung zu erwarten sind. Andererseits suchten wir Hemmungen durch Stoffe auszuschalten, die sich zwar bei der Kondensation im Laboratorium bilden, in der Pflanze aber kaum eine Rolle spielen dürften.

Wenn sich auch die Verhältnisse als viel komplizierter herausstellten, als anfangs zu erwarten gewesen war, so gelang es doch, die Zusammenhänge vollständig zu klären.

So wurde es möglich, die Kondensation schon in sehr kurzer Zeit durchzuführen. Setzten wir nämlich *Zucker* als Katalysatoren hinzu, so war die Kondensation schon beendet, bevor die übliche Kondensationstemperatur erreicht wurde, die sonst 15 Minuten lang einwirken muß.

Unsere Untersuchungen gruppierten sich um folgende Fragen:

I. Welche Produkte entstehen aus Formaldehyd bei der Kondensation in Gegenwart von Magnesiumoxyd?

II. Besteht ein Gleichgewicht zwischen den gebildeten Produkten?

III. Von welchen Faktoren hängt die Kondensationsdauer ab?

I. Welche Produkte entstehen aus Formaldehyd bei der Kondensation in Gegenwart von Magnesiumoxyd?

H. Schmalfuss und *K. Kalle*[2]) hatten im Formaldehydkondensat außer Methylalkohol und Ameisensäure eine Triose und eine Pentose[3]) aufgefunden. Durch verschiedene Reaktionen war weiter die Anwesenheit von Ketosen sichergestellt.

[1]) Übrigens haben schon *H.* und *A. Euler* (B. **39**, 44, Anm. 1, 1906) bei ähnlich verlaufenden Zuckerbildungen Katalyse vermutet.

[2]) B. **57**, 2101, 1924.

[3]) *C. Neuberg* fand unter anderen Bedingungen bei der Formaldehydkondensation ebenfalls Pentose, Ber. **35**, 2632, 1902.



Nun wurde gefunden, daß im Kondensat außerdem noch eine Hexose enthalten ist. Dagegen waren weder Glycerinaldehyd[1]) noch Glykolaldehyd nachweisbar. Die Triose wurde mit Sicherheit als Dioxyaceton erkannt.

Geht man von einer 2% Formaldehydlösung aus, so beträgt der Zuckergehalt 1,33 ± 0,04% (berechnet als Glykose).

Von Vertretern anderer Stoffklassen fanden sich noch Diacetyl[2]) und in sauren Kondensaten Furfurol[3]) (Rötung von Anilinacetat).

Versuche.

Die Ausgangsmaterialien wurden auf Reinheit geprüft; es wurden destilliertes Wasser, frisch geglühtes Magnesiumoxyd und Formaldehydlösung (D. A. B. 6)[4]) verwandt. Die Kondensationen wurden in einem kupfernen Rührautoklaven[5]) durchgeführt, der 10 Liter faßt.

Wir beschreiben zunächst einen *normalen Kondensationsversuch*[6]): 2800 ccm destilliertes Wasser werden im gereinigten Autoklaven zum Sieden erhitzt. Dann werden 3 g Magnesiumoxyd mit 215 ccm 28% Formaldehydlösung in den Autoklaven hineingespült. Bei einer Rührgeschwindigkeit von 2,7 Umdrehungen in der Sekunde wird dann durch stärkeres Heizen der Druck auf 2 Atmosphären erhöht und das Kondensat nach weiteren 25 Minuten entnommen.

Dieses „Normalkondensat" reagiert gegen Lackmus sauer und enthält weder Formaldehyd noch ungelöstes Magnesiumoxyd. Der Zuckergehalt betrug in zehn Versuchen 1,33 ± 0,04% (berechnet als Glykose)[7]).

Wir bezeichnen die Farbtiefe der einzelnen Kondensate durch große lateinische Buchstaben. Die Buchstaben bezeichnen neun Stufen einer Farbleiter. Jede dieser Stufen enthält in 64 Teilen Lösung neben klarem Wasser (Farbtiefe A) so viel Teile des dunkelsten Kondensats (Farbtiefe R), wie die zugeordnete Zahl angibt.

A	C	E	G	I	L	N	P	R *)
0	1	4	8	16	24	32	48	64

*) Die fehlenden Stufen B, D usw. lassen sich schätzen.

---

[1]) Die auffällige Erscheinung, daß Glycerinaldehyd im Gleichgewicht so weit zurücktritt, wird weiter untersucht.

[2]) Hierüber ist an anderer Stelle ausführlich berichtet (im Druck).

[3]) Aus den gebildeten Pentosen durch die entstandene Säure. Furfurol fehlt in basischen Kondensaten.

[4]) Frische Formaldehydlösung und Formaldehydlösung, die etwa 4 Jahre gestanden hatte, verhielten sich gleich.

[5]) Beschrieben und in der Wirkung mit einer Glasbombe verglichen in der Dissertation von *K. Kalle*. Hamburg 1924.

[6]) Um Platz zu sparen, werden in den später folgenden Tabellen nur die Abweichungen von den Bedingungen dieser normalen Kondensation angegeben.

[7]) Der Zuckergehalt wurde durch Titration nach *Fehling-Soxhlet* bestimmt (*Abderhalden*, Biochem. Arbeitsmethod. II, S. 169. Berlin 1910).

Eine 9 mm dicke Schicht der einzelnen Lösungen ergab nach *W. Ostwalds* Farbenatlas in der Durchsicht folgende Zahlen:

Farbstufe	Farbton	Weißgehalt	Schwarzgehalt
A		100	0
C		74	10
E		40	29
G		26	42
I	17	16	50
L		6,6	55
N		2,9	66
P		1,8	68
R		< 1,8	79

Die Farbtiefe in zehn Normalkondensaten schwankte zwischen C und D.

a) Nachweis von Hexose.

Die Hexose wurde nach *C. Wehmer* und *B. Tollens*[1]) durch Überführung in lävulinsaures Silber nachgewiesen.

0,1696 g Substanz: 0,1660 g CO_2, 0,0474 g H_2O, 0,0824 g Ag:
$C_5H_7O_3Ag$. Ber.: C 26,92, H 3,17, Ag 48,38.
Gef.: C 26,70, H 3,13, Ag 48,59.

b) Nachweis von Diacetyl[2]) *im Abdampf des Kondensats.*

Von dem verdichteten Abdampf (jeweils etwa 75 ccm) mehrerer Kondensate wurden je 2 ccm abdestilliert. Aus diesen Destillaten wurde Diacetyl als Dioxim isoliert.

c) Prüfung auf Glycerinaldehyd und Glykolaldehyd.

Die Probe von *Wohl* und *Neuberg*[3]) auf Glycerinaldehyd und die Proben mit fuchsinschwefliger Säure[4]) auf Aldehyd verliefen mit formaldehydfreiem[5]) Kondensat negativ. Gegenproben mit 0,08% Lösung der Aldehyde in Wasser oder in Kondensat verliefen positiv.

Es sind also keine erheblichen Mengen Glycerinaldehyd oder Glykolaldehyd im Kondensat enthalten.

---

[1]) *Abderhalden*, Biochem. Arb. II, S. 104. Berlin 1910. *C. Wehmer* und *B. Tollens*, Ann. Chem. **248**, 314, 1888.

[2]) Näheres siehe *Hans Schmalfuss* und *Helene Barthmeyer*, B. **60**, 1035, 1927.

[3]) *A. Wohl* und *C. Neuberg*, B. **33**, 3104, 1900.

[4]) *Dieselben*, ebendaselbst **33**, 3096, 1900.

[5]) Formaldehyd würde beide Proben an sich schon positiv verlaufen lassen.

II. Besteht ein Gleichgewicht zwischen den gebildeten Produkten?

Entnimmt man während der Kondensation fortlaufend Proben, so kann man feststellen, daß die Oxydoreduktion des Formaldehyds sofort einsetzt. Dagegen bilden sich die verschiedenen Zucker erst nach etwa 20 Minuten plötzlich und schnell. Doch zeigen die später aufgeführten, kurz dauernden Kondensationen, daß die Oxydoreduktion nicht etwa Vorbedingung für die Zuckerbildung ist, sondern eine Konkurrenzreaktion, die sich hintanhalten läßt.

Ob die Zucker unabhängig voneinander entstehen oder nicht, prüften wir, indem wir eine Hexose sowie Dioxyaceton in wässeriger Lösung bei Gegenwart von Magnesiumoxyd bei 120° behandelten.

Wie die Untersuchung der Kondensate zeigte, wird anscheinend ein Gleichgewicht zwischen Formaldehyd, Triose, Pentose und Hexose angestrebt, doch werden die gebildeten Produkte rasch weiter verändert.

Diese Umwandlungen besitzen für das Verständnis mancher Vorgänge im Zuckergebiet besondere Bedeutung. Ich werde in Kürze über solche Umwandlungen eingehend berichten.

III. Von welchen Faktoren hängt die Kondensationsdauer ab?

Vorbemerkungen[1]).

Vor jedem Versuch muß der Autoklav aufs sorgfältigste ausgedämpft und ausgespült werden. Denn läßt man den Autoklaven unausgespült stehen, so bildet sich Kupferformiat, das die Kondensation sehr stark hemmt. Nach längerem Stehen ist dann zunächst gar keine Kondensation zu erzielen. Erst nach mehreren Kondensationsversuchen wird die Kondensationsdauer wieder normal. Auf den hemmenden Einfluß des Kupferformiats kommen wir noch zurück (S. 78).

Bei der Untersuchung der Kondensate zeigte sich, daß der Zuckergehalt abnahm[2]), wenn länger als nötig kondensiert wurde. Ein Teil des erst gebildeten Zuckers zersetzt sich beim weiteren Erhitzen unter Bräunung.

Zeit Minuten	Farbe	Zuckergehalt (ber. als Glykose) %
25	C	1,33
70	G	0,92
120	J	0,86

Ferner ist darauf zu achten, daß die basisch reagierenden Kondensate schnell abgekühlt werden, und daß der Zuckergehalt sofort bestimmt

[1]) Alle Versuche wurden mindestens zweimal mit gleichem Ergebnis durchgeführt.

[2]) Vgl. hierzu *H. Schmalfuss* und *H. Barthmeyer*, B. 60, 1035, 1927.

wird. Denn bei längerem Stehen des heißen Kondensats zersetzt sich auch außerhalb des Autoklaven ein Teil des gebildeten Zuckers wieder. Saure Kondensate sind naturgemäß weniger empfindlich.

Reaktion des Kondensats	Temperatur des Kondensats		Zuckergehalt des Kondensats (berechnet als Glykose)	
	anfangs °C	nach 5 Std. °C	anfangs %	nach 5 Std. %
s	10	18	1,33	1,33
b	10	18	1,33	1,33
s	100	40	1,33	1,33
b	100	40	1,33	**1,12**

Temperatur, Druck, Zeit.

Bei 100° unter Atmosphärendruck entstehen Produkte gleichen Reduktionswertes wie bei 120° und 2 Atmosphären Überdruck.

Die Kondensationsdauer nimmt entsprechend der Temperaturerhöhung ab. Die Kondensation dauert in der Glasbombe[1]) bei 100° 10 Stunden, bei 120° nur 2 Stunden 40 Minuten. Im Autoklaven[1]) verlaufen die Kondensationen, wohl infolge der besseren Durchmischung, schneller, bei 100° in 1 Stunde 40 Minuten und bei 120° in 25 Minuten.

Bei Zimmertemperatur bildete sich aber selbst nach mehrmonatigem Stehen im Dunkeln kein Zucker.

Nr.	Bedingungen				Ausgangsmaterialien			Kondensat				
	Gefäß	Temperatur °C	Überdruck Atm.	Kondensationsdauer	H_2O ccm	28% HCHO ccm	MgO g	Farbtiefe	MgO ungelöst	HCHO	Lackmusreaktion	Zuckergehalt (ber. als Glykose) %
1	Autoklav	100	0	1h40′	2800	215	3	D	—*)	—	s	1,29
2	„	120	2	25	2800	215	3	D	—	—	s	1,32
3	Glasbombe	120	2	2 40	100	7	0.5	E	+	—	b	0,96
4	„	100	0	10	100	7	0,5	C	+	—	b	0,94
5	„	95	0	20	100	7	0,5	A	+	+	b	0,04†)
6	300-ccm-Kolben	18	0	3½ Monat	100	7	0,5	A	+	+	b	0,04†)

*) — bedeutet nicht vorhanden, + bedeutet vorhanden. — †) Formaldehyd-Titrationswert.

Bei 95° fand keine Kondensation mehr statt.

Absolute Mengen.

Gegen die obigen Versuche könnte noch der Einwand erhoben werden, daß im Autoklaven größere Mengen kondensiert wurden als

[1]) Beschrieben in der Dissertation von *K. Kalle*. Hamburg 1924.

in der Glasbombe. Doch zeigen die folgenden Versuche, daß die Kondensation verschieden großer absoluter, aber relativ gleicher Mengen in gleichen Zeiten zu Produkten gleichen Reduktionswertes führen:

Nr.	Ausgangsmaterialien			Kondensat				
	H_2O ccm	28 % HCHO ccm	MgO g	Farbtiefe	MgO ungelöst	HCHO	Lackmusreaktion	Zuckergehalt (berechnet als Glykose) %
1	2800	215	3	C	—	—	s	1,34
2	1866	144	2	C	—	—	s	1,34
3	933	72	1	C	—	—	s	1,34

Alle Versuche beanspruchten im Autoklaven bei 120° 25 Minuten Zeit zu ihrer Vollendung.

Katalysatoren.

Auf Grund der Analyse des Kondensats genügte es, den Einfluß folgender Faktoren auf die Kondensationsdauer zu untersuchen:

1. Wasserstoffionenkonzentration.
2. Methylalkohol und Magnesiumformiat (Produkte der Oxydoreduktion des Formaldehyds).
3. Magnesiumion und Formiation.
4. Kondensat.

1. Wasserstoffionenkonzentration.

Wendet man für die Kondensation in Serienversuchen wachsende Mengen Magnesiumoxyds an, so zeigt sich, daß die Kondensationsdauer mit steigender Menge Magnesiumoxyds abnimmt. Doch größere Mengen Magnesiumoxyds, als zum Abfangen der entstehenden hemmenden Säure nötig sind, verkürzen die Kondensationsdauer nicht weiter.

Nr.	MgO g	Lackmusreaktion	Zuckergehalt (berechnet als Glykose) nach 15 Min. %	nach 25 Min. %
1	0	s	0,04	0,04
2	3	s	0,04	1,35
3	10	b	1,33	1,09
4	30	b	1,32	1,09

Das Magnesiumoxyd dient also gleichzeitig als Abfänger für die Säure und in Verbindung mit Wasser als kondensierende Base. Die Wasserstoffionenkonzentration, die durch das Magnesiumoxyd gegeben ist, ist verhältnismäßig groß. Infolgedessen werden die gebildeten

Zucker nur verhältnismäßig langsam verändert. Wird eine geringere Wasserstoffionenkonzentration (durch äquivalente Mengen Calciumhydroxyd oder Natriumhydroxyd) angewendet, so wird der Formaldehyd zwar schneller zu Zuckern kondensiert, aber die Zucker verändern sich auch viel schneller. Andererseits ist die Wasserstoffionenkonzentration bei Gegenwart einer äquivalenten Menge Aluminiumoxydhydrats schon zu groß, als daß noch Kondensation stattfände.

Nr.	Base		Reaktionszeit	Kondensat			Zuckergehalt (berechnet als Glykose)
	g *)	Art	Min.	Farbtiefe	Formaldehyd	Lackmusreaktion	%
1	10	MgO	2	A	+	b	0,04
			5	A	+	b	0,04
			15	C	—	b	1,33
			25	D	—	b	1,09
2	16	CaO	5	C	—	b	1,33
3	10	$NaOH$	2	S	—	b	0,77 †)
4	19,5	$Al(OH)_3$	25	A	+	n	0,04
5	25,5	Al_2O_3	25	A	+	n	0,04

*) Die angewendeten Mengen der verschiedenen Basen sind 10 g MgO äquivalent. Nur bei Al_2O_3 wurde die doppelte Menge verwandt, aber trotzdem keine Kondensation erzielt.
†) Nach 2 Minuten ist die Kondensation beendet, doch ist der Zucker schon zum großen Teil wieder zersetzt.

Methylalkohol und Magnesiumformiat.

Aus mehreren Versuchen ergab sich, daß von den Produkten der Oxydoreduktion der Methylalkohol die Kondensation nicht beeinflußt. Die Kondensationsdauer beträgt auch bei Gegenwart von Methylalkohol 25 Minuten. Das Magnesiumformiat dagegen verkürzt die Reaktionsdauer beträchtlich, bei den gewählten Mengenverhältnissen auf 10 Minuten, also um 60%. Gegenwart von Methylalkohol ändert hieran nichts.

Nr.	Reaktionszeit Minuten	CH_3OH g	$Mg(HCOO)_2$ g	Farbtiefe	MgO ungelöst	HCHO	Lackmusreaktion	Zuckergehalt (berechnet als Glykose) %
1	10			A	+	+	b	0,04
	25	—	—	C	—	—	s	1,32
	100			G	—	—	s	0,90
2	10			A	+	+	b	0,04
	25	32	—	C	—	—	s	1,34
	100			G	—	—	s	0,90
3	10			C	+	—	b	1,10
	25	—	57	G	—	—	s	0,97
	100			E	—	—	s	0,59
4	10			C	+	—	b	1,11
	25	32	57	G	—	—	s	1,99
	100			L	—	—	s	0,59

Magnesiumion und Formiation.

Die fördernde Wirkung des Magnesiumformiats konnte entweder auf der Wirkung des Magnesiumions oder des Formiations beruhen, oder schließlich eine spezifische Wirkung des undissoziierten Magnesiumformiatmoleküls sein. Deshalb wurden im Vergleich sowohl Magnesiumsalze anderer Säuren wie Formiate anderer Metalle verwandt. Beruhte die Wirkung auf dem Magnesiumion, so mußten andere Magnesiumsalze ähnlich fördern wie Magnesiumformiat. Dagegen durften andere Formiate als Magnesiumformiat die Reaktionsdauer nicht verkürzen. In der Tat zeigte sich, daß äquivalente Mengen Magnesiumacetat und Magnesiumchlorid die Kondensationsdauer ebenso wie Magnesiumformiat um 60% verkürzen. Dagegen verkürzen Natriumformiat, Kaliumformiat und Calciumformiat die Kondensationsdauer nicht. Kupferformiat gar hemmt die Reaktion außerordentlich stark. Schon durch eine Konzentration von 0,017% wird die Kondensationsdauer auf 1 Stunde, also um 140% verlängert[1]).

Nr.	Zeit Min.	MgO g	Salz *) g	Farb. tiefe	MgO ungelöst	HCHO	Lackmus-reaktion	Zuckergehalt (berechnet als Glykose) %
1	15	3	—	A	—	+	s	0,05
	25			C	—	—	s	1,32
	60			G	—	—	s	0,93
2	15	23	—	C	+	—	b	1,31
3	15	3	71 g $Mg(CH_3COO)_2$	D	—	—	s	1,31
4	15	3	47,5 g $MgCl_2$	C	—	—	s	1,33
5	15	23	34 g NaHCOO	C	+	—	b	1,32
6	15	23	42 g KHCOO	C	+	—	b	1,33
7	15	23	65 g $Ca(HCOO)_2$	C	+	—	b	1,33
8	25	3,13†)	0,5 g $Cu(HCOO)_2$	A	—	+	s	0,05
	60			C	—	—	s	1,32
9	25	3,13	—	C	—	—	s	1,34
	60			G	—	—	s	0,93

*) Die zugesetzten Salzmengen, außer beim Kupferformiat, sind der Menge Magnesiumformiat äquivalent, die in den Versuchen mit Magnesiumformiat und Methylalkohol zugesetzt wurden.

†) 3,13 g, um einem Magnesiumoxydverlust durch doppelte Umsetzung vorzubeugen.

Der fördernde Faktor im Magnesiumformiat ist also nicht das Formiation oder das undissoziierte Molekül, sondern das Magnesiumion[2]).

[1]) Vgl. hierzu die Empfindlichkeit gewisser grüner Algen gegen Kupferion.

[2]) Dies ist nur für Kondensationen mit *Magnesium*oxyd ermittelt. Die Bedeutung des Metallions wird näher untersucht.

Kondensat. Da das Kondensat Magnesiumformiat enthält, muß auch Kondensat, das den Ausgangsmaterialien für eine Kondensation zugesetzt wird, die Kondensationsdauer verkürzen. Je nach der Menge des Magnesiumoxyds reagieren nun fertige Kondensate sauer oder basisch gegen Lackmus. Die sauren Kondensate verkürzen entsprechend ihrem geringen Magnesiumformiatgehalt unter den gewählten Bedingungen die Kondensationsdauer nur wenig, nämlich auf 20 Minuten, also um 20 %. Man hätte erwarten sollen, daß basische Kondensate, die nur wenig mehr Magnesiumformiat enthalten können, etwa ebensowenig die Kondensationsdauer verkürzen wie saure Kondensate. Auffälligerweise wurde die Kondensationsdauer durch basische Kondensate aber auf 5 Minuten, also um 80 %, verkürzt.

Diese Wirkung konnte unmöglich mehr auf Magnesiumion allein zurückgeführt werden. Wegen der Wichtigkeit des Befundes führen wir je drei Versuche an.

Im basischen Kondensat mußte also außer dem Magnesiumformiat noch ein anderer fördernder Katalysator vorhanden sein. Dieser Katalysator konnte im sauren Kondensat entweder fehlen oder durch Hemmer paralysiert sein.

Aus der Analyse der Kondensate ist bereits bekannt, daß saure Kondensate im Gegensatz zu den basischen neben freier Säure noch *Furfurol* enthalten.

Eine etwaige Hemmung des fördernden Katalysators konnte demnach entweder auf der Wirkung der Säure oder des Furfurols oder beider gemeinsam beruhen.

Wir wissen bereits, daß Säure allein die Kondensation hemmt. Denn die Kondensation verläuft um so schneller, je mehr wir von der auftretenden Säure durch Magnesiumoxyd abfangen[1]).

Setzt man einem normalen Gemisch, das also ein saures Kondensat ergibt, vor der Kondensation Furfurol zu, so wird die Kondensationsdauer beträchtlich verlängert, und zwar proportional der zugesetzten Menge Furfurol. Dagegen hemmt Furfurol nicht, wenn Magnesiumoxyd im Überschuß vorhanden ist. Hieraus ergibt sich, daß *Furfurol allein die Kondensation nicht hemmt, daß es vielmehr nur die Wirkung der Säure beträchtlich steigert.* Unter den gewählten Bedingungen verlängern 3,3 g Furfurol die Kondensationsdauer etwa um 380 %.

---

[1]) Daß die Säure hemmt, nicht aber das Magnesiumoxyd fördert, ergibt sich daraus, daß die kürzeste Kondensationsdauer erreicht ist, sobald die Säure vollständig neutralisiert ist. Größere Mengen Magnesiumoxyds verkürzen die Dauer der Kondensation dann nicht weiter.



Nr.	Reaktionszeit Minuten	H_2O ccm	Zugesetztes altes Kondensat					25% HCHO ccm
			ccm	Farbtiefe	HCHO	Ungelöstes MgO	Lackmusreaktion	
1	20	2800	—	—	—	—	—	215
	20	2800	—	—	—	—	—	215
	20	2800	—	—	—	—	—	215
2	20	1400	1400	E	—	—	s	215
	20	1400	1400	E	—	—	s	215
	20	1400	1400	E	—	—	s	215
3	20	1400	1400	E	—	—	s	108
	20	1400	1400	E	—	—	s	108
	20	1400	1400	E	—	—	s	108
4	20	1400	1400	E	—	—	s	—
	20	1400	1400	E	—	—	s	—
	20	1400	1400	E	—	—	s	—
5	20	1400	1400	E	—	—	s	—
	20	1400	1400	E	—	—	s	—
	20	1400	1400	E	—	—	s	—
6	5	2800	—	—	—	—	—	215
	5	2800	—	—	—	—	—	215
	5	2800	—	—	—	—	—	215
7	5	2800*)	—	—	—	—	—	215
	5	2800*)	—	—	—	—	—	215
	5	2800*)	—	—	—	—	—	215
8	5	1400	1400	G	—	+	b	215
	5	1400	1400	G	—	+	b	215
	5	1400	1400	G	—	+	b	215
9	5	1400	1400	G	—	+	b	108
	5	1400	1400	G	—	+	b	108
	5	1400	1400	G	—	+	b	108
10	5	1400	1400	G	—	+	b	—
	5	1400	1400	G	—	+	b	—
	5	1400	1400	G	—	+	b	—
11	5	1400	1400	G	—	+	b	—
	5	1400	1400	G	—	+	b	—
	5	1400	1400	G	—	+	b	—

*) Das Wasser wurde vor der Verwendung mit Magnesiumoxyd im Autoklaven bei 2 Atm. Überdruck

H_2O ccm	MgO g	Kondensat Farbtiefe	HCHO	Ungelöstes MgO	Lackmusreaktion	Gesamtzuckergehalt (ber. als Glykose) %	Neugebildeter Zucker %
—	3	A	+	—	s	0,05	—
—	3	A	+	—	s	0,06	—
—	3	A	+	—	s	0,05	—
							Nr. 2 minus Nr. 4
—	3	E	—	—	s	1,67	1,36
—	3	E	—	—	s	1,69	1,35
—	3	E	—	—	s	1,65	1,35
							Nr. 3 minus Nr. 5
—	1,5	E	—	—	s	1,02	0,69
—	1,5	E	—	—	s	1,01	0,68
—	1,5	E	—	—	s	1,00	0,68
215	3	L	—	—	s	0,31	—
215	3	L	—	—	s	0,34	—
215	3	L	—	—	s	0,30	—
108	1,5	L	—	—	s	0,33	—
108	1,5	L	—	—	s	0,33	—
108	1,5	L	—	—	s	0,32	—
—	3	A	+	+	b	0,03	—
—	3	A	+	+	b	0,04	—
—	3	A	+	+	b	0,04	—
—	3	A	+	+	b	0,09	—
—	3	A	+	+	b	0,04	—
—	3	A	+	+	b	0,04	—
							Nr. 8 minus Nr. 10
—	3	G	—	+	b	1,43	1,08
—	3	G	—	+	b	1,46	1,14
—	3	G	—	+	b	1,47	1,18
							Nr. 9 minus Nr. 11
—	1,5	G	—	+	b	0,90	0,54
—	1,5	G	—	+	b	0,88	0,56
—	1,5	G	—	+	b	0,84	0,53
215	3	J	—	+	b	0,35	—
215	3	J	—	+	b	0,32	—
215	3	J	—	+	b	0,29	—
108	1,5	J	—	+	b	0,36	—
108	1,5	J	—	+	b	0,32	—
108	1,5	J	—	+	b	0,31	—

120° gesättigt und filtriert.

Nr.	Zeit	Ausgangsmaterialien					Kondensat					
		H_2O	28% HCHO	H_2O	MgO	Furfurol	Farbtiefe	MgO ungelöst	HCHO	Lackmusreaktion	Zuckergehalt (berechnet als Glykose)	Neugebildeter Zucker
	Min.	ccm	ccm	ccm	g	g					%	%
1	25	930	72	—	1	—	C	—	—	s	1,34	
	70						G	—	—	s	0,92	
	120						J	—	—	s	0,87	
2	15	930	72	—	3,3	—	C	+	—	b	1,31	
3	25	930	72	—	1	1,7	A	—	+	s	0,92	Nr. 3 minus Nr. 7 1,33
	70						C	+	—	s	1,35	
4	15	930	72	—	3,3	1,7	C	+	—	b	1,32	Nr. 4 minus Nr. 8 1,30
5	25	930	72	—	1	3,3	A	—	+	s	0,06	Nr. 5 minus Nr. 9 1,33
	70						A	—	+	s	0,97	
	120						C	—	—	s	1,37	
6	15	930	72	—	3,3	3,3	C	+	—	b	1,34	Nr. 6 minus Nr. 10 1,30
7	25	930	—	72	1	1,7	A	+	—	b	0,02	
	70						A	+	—	b	0,02	
8	15	930	—	72	3,3	1,7	A	+	—	b	0,02	
9	25	930	—	72	1	3,3	A	+	—	b	0,04	
	70						A	+	—	b	0,04	
	125						A	+	—	b	0,04	
10	15	930	—	72	3,3	3,3	A	+	—	b	0,04	

Falls Furfurol und Säure für den Unterschied in der fördernden Wirkung von zugesetztem saurem und basischem Kondensat ausreichten, mußten folgende Forderungen durch den *Versuch* bestätigt werden können:

1. Unter den gewählten Bedingungen mußte die Kondensation am längsten dauern, wenn unter dem Einfluß zugesetzten sauren Kondensats ein neues saures Kondensat entsteht. Denn dann wirken Säure und Furfurol gemeinsam. Die Kondensationsdauer betrug in der Tat 20 Minuten.

2. Derselbe Versuch, doch mit einem Überschuß an MgO, mußte in der kürzesten Zeit beendet sein. Denn dann ist nur Furfurol zugegen, das allein nicht hemmt. Die Kondensation dauerte weniger als 5 Minuten.

3. Wird basisches Kondensat so stark angesäuert, daß es als Zusatz zu einem Kondensatgemisch saures Kondensat entstehen läßt, so muß die Kondensation etwas länger dauern als die vorige. Denn Säure allein hemmt schwach. Der Versuch ergab genau 5 Minuten, das Kondensat des vorigen Versuchs war nach 5 Minuten zum Teil schon wieder zersetzt.

4. Wird basisches Kondensat angesäuert und dann einem Kondensatgemisch mit überschüssigem MgO zugesetzt, so muß die Kondensation ebenfalls in kürzester Zeit beendet sein, da weder Säure noch Furfurol zugegen sind. Die Kondensation war in weniger als 5 Minuten beendet.

Folgendes Schema erleichtert das Verständnis:

Nr.	Zugesetztes altes Kondensat	Neues Kondensat	Das Kondensat enthielt	Kondensationsdauer Minuten
1	Saures Kondensat + wenig MgO	sauer	Säure und Furfurol	20
2	„ „ + viel „	basisch	Furfurol allein	< 5
3	Angesäuertes basisches Kondensat + wenig MgO	sauer	Säure allein	5
4	Angesäuertes basisches Kondensat + viel MgO	basisch	—	< 5

Nr.	Reaktionszeit Min.	H_2O ccm	28% HCHO ccm	H_2O ccm	MgO g	Altes Kondensat: ccm	Altes Kondensat: Lackmusreaktion	Neues Kondensat: Lackmusreaktion	Neues Kondensat: Zuckergehalt (berechnet als Glykose) %	Neues Kondensat: Neu gebildeter Zucker (berechnet als Glykose) %
										Nr. 1 minus Nr. 2
1	20	1400	215	—	3	1400	s	s	1,70	1,35
2	20	1400	—	215	3	1400	s	b	0,35	
										Nr. 3 minus Nr. 4
3	5	1400	215	—	3	1400	s → b	b	1,45	1,10
4	5	1400	—	215	3	1400	s → b	b	0,35	
										Nr. 5 minus Nr. 6
5	5	1400	215	—	3	1400	b → s	s	1,74	1,38
6	5	1400	—	215	3	1400	b → s	b	0,36	
										Nr. 7 minus Nr. 8
7	5	1400	215	—	10	1400	b → s	b	1,47	1,12
8	5	1400	—	215	10	1400	b → s	b	0,35	

Nachdem der Unterschied zwischen saurem und basischem Kondensat auf den Mehrgehalt des sauren Kondensats an Furfurol und Säure zurückgeführt war, konnte der fördernde Anteil nunmehr nur noch etwas Stoffliches sein, das beiden Kondensaten gemeinsam war, nämlich *Diacetyl* oder *Zucker* oder beide gemeinsam.

Versuche ergaben, daß *Diacetyl* die Kondensationsdauer nicht beeinflußt.

Nr.	Kondensationszeit Minuten	H_2O ccm	28% HCHO ccm	H_2O ccm	MgO g	Diacetyl Tropfen *)	Lackmusreaktion	Zuckergehalt (berechnet als Glykose) %
1	25	930	72	—	1	—	s	1,34
2	15	930	72	—	3,3	—	b	1,31
3	25	930	72	—	1	4	s	1,33
4	15	930	72	—	3,3	4	b	1,31
5	25	930	—	72	1	4	b	—
6	15	930	—	72	3,3	4	b	—

*) Ein Tropfen = 1/20 ccm.

Dagegen verkürzen *Zucker* die Kondensationsdauer ganz bedeutend, viel mehr als Magnesiumformiat.

Nr.	Wasser ccm	28% Formaldehyd ccm	Wasser ccm	MgO g	Zucker g	Zucker Art	Kondensationszeit Min.	Farbtiefe	Gesamtzuckergehalt (berechnet als Glykose) %	Neugebildeter Zucker (berechnet als Glykose) %
1	2800	215	—	10	—	—	10	A	0,04	0,04
							15	C	1,32	1,32
2	2800	215	—	10	2,24	Fructose	10	D	1,37	1,33
3	2800	—	215	10	2,24	„	10	E	0,04	—
4	2800	215	—	10	4,5	„	5	C	1,44	1.35
5	2800	—	215	10	4,5	„	5	E	0,09	—
6	2800	215	—	10	4,5	Dioxyaceton	5	D	1,49	1,33
7	2800	—	215	10	4,5	„	5	D	0,16	—

Auf Grund der so gewonnenen Erkenntnisse führten wir eine Kondensation von 3 Liter 2% Formaldehyds in Gegenwart von 2% Glykose und 10 g Magnesiumoxyd durch. Wir hatten, wie üblich, bei 2 Atmosphären kondensieren wollen, doch schon kurz bevor wir 2 Atmosphären Druck erreicht hatten, war die Kondensation beendet.

Zusammenfassung.

1. Es wird angenommen, daß die Zuckerbildung aus Formaldehyd in grünen Pflanzen autokatalytisch gefördert wird (S. 70).

2. Bei der Kondensation von Formaldehyd unter Druck in Gegenwart von Magnesiumoxyd entsteht außer Methylalkohol, Ameisensäure, Triose und Pentose, die schon früher gefunden wurden, noch Hexose; von Vertretern anderer Stoffklassen wurden noch Diacetyl und in sauren Kondensaten auch Furfurol gefunden. Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd waren nicht nachzuweisen. Die Triose wurde als Dioxyaceton erkannt (S. 71 und 73).

3. Bei der Kondensation entstehen aus einer 2% Formaldehydlösung im Mittel 1,33% Zucker (berechnet als Glykose) (S. 72).

4. Die Bildung von Ameisensäure und Methylalkohol zu Beginn der Kondensation ist gegenüber der Zuckerbildung eine Konkurrenzreaktion. Sie läßt sich hintanhalten (S. 74).

5. Anscheinend wird ein Gleichgewicht zwischen Formaldehyd, Triose, Pentose und Hexose angestrebt, doch werden die gebildeten Produkte rasch weiter verändert (S. 74).

6. Bei 100^0 entstehen Produkte gleichen Reduktionswertes wie bei 120^0 und 2 Atmosphären Überdruck. Die Kondensationszeit nimmt entsprechend der Temperaturerhöhung ab. Unter sonst gleichen Bedingungen findet bei 95^0 keine Kondensation mehr statt (S. 75)

7. Kondensation verschieden großer absoluter, aber relativ gleicher Mengen führen in gleichen Zeiten zu Produkten gleichen Reduktionswertes (S. 75).

8. Die Kondensationsdauer nimmt mit steigender Magnesiumoxydmenge ab. Doch verkürzen größere Mengen Magnesiumoxyds, als zum Abfangen der entstehenden hemmenden Säure nötig sind, die Kondensationsdauer nicht weiter. Calciumhydroxyd und Natriumhydroxyd kondensieren zwar schneller, doch werden die entstandenen Zucker rasch weiter verändert. Andererseits ist Aluminiumoxydhydrat eine zu schwache Base, als daß sie noch kondensieren könnte (S. 76),

9. Methylalkohol beeinflußt die Kondensationsdauer nicht (S. 77).

10. Magnesiumformiat verkürzt die Kondensation beträchtlich (S. 77).

11. Äquivalente Mengen Magnesiumacetat, Magnesiumchlorid und Magnesiumformiat verkürzen die Kondensationsdauer in gleicher Weise; Natriumformiat, Kaliumformiat und Calciumformiat verkürzen dagegen die Kondensationsdauer nicht. Kupferformiat hemmt die Kondensation außerordentlich stark. Der fördernde Faktor im Magnesiumformiat ist also nicht das Formiation oder das undissoziierte Molekül, sondern das *Magnesiumion* (S. 78).

12. Zugesetztes altes Kondensat verkürzt die Kondensationsdauer, doch basisches wesentlich mehr als saures (S. 79 bis 83).

13. Säure hemmt die Kondensation. Diese Hemmung wird durch Furfurol beträchtlich gesteigert. In basischer Lösung beeinflußt Furfurol die Kondensationsdauer nicht (S. 79 bis 83).

14. Diacetyl beeinflußt die Kondensationsdauer nicht (S. 83).

15. *Zucker* fördert unter geeigneten Bedingungen die Kondensation so stark, daß sie schon beendet ist, bevor die übliche Kondensationstemperatur erreicht wird (S. 84).

Röntgenographische Untersuchungen an Harzen.

Von

Stefan v. Náray-Szabó.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Faserstoffchemie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 24. März 1927.)

Die Harze erscheinen dem Auge teils als homogene Körper, teils als Gemenge. Es schien der Prüfung wert, zu ermitteln, welches Verhalten diese noch so unbekannten Naturstoffe gegen das Röntgenlicht zeigen, zumal das Ergebnis Hinweise für die chemische Erschließung bringen konnte.

Die röntgenographische Untersuchung einer Anzahl von Harzen wurde an geschliffenen Harzstäbchen mit Cu-Strahlung gemacht. Es ergab sich, daß bei den Harzen alle Übergänge von dem amorphen zu dem kristallinen Zustande auftreten.

Tabelle I.

Amorphe Harze.

	Öffnungswinkel ϑ der Ringe			Bemerkung
Zanzibarkopal, glatt	—	—	14° 10′ st.	
„ „ gänsehäutig	—	—	14 10 „	
Kaurikopal, hell	—	—	14 36 „	Rezent fossil
„ braun	—	—	14 36 „	„ „
Dammar Indagiri	—	6° 33′ schw.	14 28 „	
„ Padang	—	7 15 „	14 36 „	
„ Batavia	—	7 48 „	14 28 „	
Mastix	—	8 34 st.	14 20 „	
Sandarak	—	9 10 „	14 34 „	
Weihrauch	—	8 36 „	12 26 m.	
Bernstein	—	7 57 schw.	14 42 st.	Fossil
Bakelit A	—	8 34 „	18 25 „	Kunstharz
Gummigutt	5° 39′ schw.	9 8 m.	17 33 m.	

st.: stark, m.: mittel, schw.: schwach.

Aus Tabelle I ergibt sich, daß verschiedene Handelssorten von Zanzibarkopal bzw. Kaurikopal denselben Interferenzring ergeben. Bei den Dammarsorten ist der äußere starke Ring innerhalb der Meß-

genauigkeit identisch, die inneren schwachen Ringe weichen voneinander ab.

Bei einigen hier angeführten Harzen zeigt sich aber schon die Gegenwart kristallisierter Stoffe an.

In der Tabelle II sind die Interferenzen der feinkristallinen Harze angegeben.

Tabelle II.

Kristalline Harze.

Öffnungswinkel:

Schellack . . .	13° 54′ m., 16° 42′ st., 17° 37′ st., 18° 11′ m., 18° 54′ schw.
Benzoe Sumatra	5° 58′ m., 18° 37′ st., 24° 6′ m., 27° 17′ m., 37° 23′ schw., 42° 31′ schw.
Benzoe Siam. .	8° 17′ m., 16° 30′ m., 20° 57′ st., 25° 12′ st. 27° 47′ schw., 30° 58′ schw.
Elemi	8° 38′ schw., 12° 56′ schw., 21° 25′ m., 25° 58′ st., 29° 24′ m., 32° 22′ schw., 35° 9′ schw., 41° 24′ schw., 45° 5′ schw., 50° 37′ schw., 53° 56′ schw., 59° 9′ schw., 61° 34′ schw.

Bei Schellack sind die Ringe ziemlich unscharf, bei den Benzoearten dagegen gut differenziert. Der chemische Unterschied zwischen Sumatra- und Siambenzoe (Hauptbestandteile: Benzoe- bzw. Zimtsäure) tritt auch an den Diagrammen klar zutage. Elemiharz zeigt etwa 13 Ringe, an welchen die Interferenzflecke größerer Kriställchen erscheinen.

Es besteht also in einigen Fällen die Möglichkeit, die chemische Untersuchung der Harze durch die Röntgenanalyse zu ergänzen.

Über die Löslichkeit der Harnsäure in kohlensauren Salzen und ihre Beeinflussung durch Kohlensäure.

Von

S. Lang und **H. Lang** (Karlsbad).

(Eingegangen am 24. März 1927.)

In der umfangreichen Literatur über die Löslichkeit der Harnsäure sind Angaben über ihre Löslichkeit in kohlensauren Salzen und über den Einfluß der Kohlensäure nur spärlich zu finden; systematische Untersuchungen in dieser Richtung liegen überhaupt nicht vor.

In allen Lehrbüchern wird eine Arbeit von *Jahns*[1]) angeführt, nach der die Löslichkeit der Harnsäure in Carbonaten proportional dem Gehalt an Carbonat erfolgt. Diese Untersuchungen beziehen sich aber auf die Löslichkeit der Harnsäure in carbonathaltigen Mineralwässern; zur Aufklärung dieser Harnsäurelöslichkeit in Mineralwässern stellte *Jahns* einige wenige Vergleichsversuche über Löslichkeit der Harnsäure in Lösungen kohlensaurer Salze an [Methode: Ein Überschuß von Harnsäure wurde mit 0,4 bis 0,5 g kohlensaurem Salz (Na_2CO_3, $NaHCO_3$ und Li_2CO_3), gelöst in 200 ccm Wasser, bei 40° C in offenen Schalen digeriert und die in Lösung gegangene Harnsäure durch Zurückwägen bestimmt], die zu dem Resultat führten, daß das Lösungsvermögen carbonathaltigen Mineralwassers bei hinlänglicher Verdünnung (weil sonst das in Lösung gegangene harnsaure Natrium wieder ausfällt) ihrem Gehalt an Carbonaten parallel geht. Einzelne Versuche finden sich sonst verstreut in der Literatur, so z. B. bei *Gudzent*[2]), der aus dem Ergebnis von zwei solchen Versuchen und anschließender physikalisch-chemischer Berechnung eine wichtige Stütze für seine Anschauung über die Lösungsform der Harnsäure im Blute ableitete.

Untersuchungen, welche das Lösungsvermögen des Karlsbader Mineralwassers für Harnsäure unter bestimmten Bedingungen feststellen sollten, hatten nun das auffallende Ergebnis, daß die Mengen der in Lösung gegangenen Harnsäure nicht nur weit hinter dem theoretisch

---

[1]) *Jahns*, Arch. d. Pharmacie **221**, 511, 1883.
[2]) *F. Gudzent*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **63**.

zu erwartenden Werte zurückblieben, sondern auch in Verdünnungen des Mineralwassers, die unter sorgfältiger Vermeidung eines Kohlensäureverlustes hergestellt wurden, keineswegs dem Verdünnungsgrad der vorhandenen Bicarbonatkonzentration geradlinig proportioniert waren. Zur Aufklärung dieser Verhältnisse ergab sich also die Notwendigkeit, das Verhalten von Harnsäure in reinen Bicarbonat- und Carbonatlösungen systematisch zu untersuchen.

Methodik. Genau abgemessene Mengen von Lösungen mit verschiedenem Gehalt an $NaHCO_3$ und Na_2CO_3 wurden in dicht schließenden Flaschen (oft unter Sicherung des Verschlusses durch federnde Klammern) mit einem Überschuß von reiner Harnsäure versetzt und bei Zimmertemperatur (18°) in einem Schüttelapparat geschüttelt. In Vorversuchen wurde die zur Erzielung maximaler Harnsäurelösung bzw. Biuratbildung nötige Zeit zu 1½ bis 1¾ Stunden ermittelt. Nach Beendigung des Schüttelns wurden die Flaschen vorsichtig dem Schüttelapparat entnommen, unter sorgfältiger Vermeidung einer Lockerung des Verschlusses 1½ bis 2 Stunden stehengelassen, um die ungelöste Harnsäure absetzen zu lassen. Die hierzu nötige Zeit sowie die Transparenz der über dem Bodensatz stehenden Flüssigkeit war in verschiedenen Versuchen verschieden. In manchen Versuchen setzte sich die Harnsäure glatt ab, unter völliger Klärung der darüber stehenden Flüssigkeit, in der Mehrzahl blieb noch eine feine, staubförmige bis opaleszente Trübung bestehen. Wie sich im Laufe der Untersuchungen erwies, *ist das völlige Absetzenlassen der ungelöst gebliebenen Harnsäurekristalle für die folgende Harnsäurebestimmung eine absolute Notwendigkeit.* Gelangen beim nachfolgenden Filtrieren Harnsäurekristalle auf das Filter, so wird ein Teil derselben infolge des beim Filtrieren eintretenden Kohlensäureverlustes durch die darüber gegossene, nun stärker alkalisch gewordene Flüssigkeit wieder gelöst und die Bestimmung der Harnsäure im Filtrat wird fehlerhaft, um so mehr, je konzentrierter die angewandte Lösung an Bicarbonat oder Carbonat ist; daher ist in solchen Lösungen eine Bestimmung der Harnsäure durch Rückwägen des ungelöst gebliebenen Anteils nicht statthaft. Ein kleiner Teil der über dem Bodensatz stehenden Flüssigkeit wurde dann vorsichtig abgegossen (oder mittels Pipette entnommen) und durch ein dichtes Filter (*Schleicher* und *Schüll*, Nr. 590) filtriert. Im klaren Filtrat wurde die im gelösten Natriumbiurat vorhandene Harnsäure (eventuell nach passender Verdünnung) durch Titration mit n/20 Kaliumpermanganat bestimmt[1]). Der Berechnung wurde für 1 ccm der von *Ritter* angegebene Faktor = 3,61 mg $\overline{U}$ zugrunde gelegt. Die auf diese Weise erhaltenen Werte sind recht genau, wenn der Gehalt der titrierten Lösung (50 ccm) an $\overline{U}$ nicht größer ist als ungefähr 20 bis 25 mg.

Es folgen nun einige durch Wägung sowie durch N-Bestimmung nach *Kjeldahl* kontrollierte Analysen.

1. 0,0302 g $\overline{U}$ werden in Na_2CO_3-Lösung gelöst, die Lösung auf 100 ccm mit Wasser aufgefüllt; 50 ccm dieser Lösung werden mit 10 ccm

[1]) Gebraucht man die Vorsicht, die Kaliumpermanganatlösung etwa 4 bis 5 Tage nach ihrer Bereitung im Dunkeln stehenzulassen, so hält sich der Titer der gegen n/20 Tetroxalatlösung gestellten Lösung lange Zeit konstant.



konzentrierter H_2SO_4 versetzt und mit Permanganat titriert. Es werden verbraucht 4,2 ccm, entsprechend 0,0303 g Ū für 100 ccm.

2. 0,0266 g Ū werden in 100 ccm Sprudelwasser völlig gelöst; 50 ccm dieser Lösung + 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure + 10 Tropfen 20% $MnSO_4$[1]) verbrauchen 3,7 ccm Permanganat, entsprechend 0,0267 g Ū in 100 ccm.

3. Ungefähr 0,6 g Harnsäure werden mit 300 ccm Sprudel geschüttelt, vom ungelösten abfiltriert; 10 ccm des Filtrats + 40 ccm Wasser + 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure + $MnSO_4$ verbrauchen 2,8 ccm Permanganat = 10,1 mg Ū. 10 ccm desselben Filtrats nach *Kjeldahl* verarbeitet, verbrauchen 1,2 ccm n/5 HCl = 10,1 mg Ū.

4. Ungefähr 0,3 g Harnsäure werden mit 250 g Sprudel geschüttelt; 20 ccm des Filtrats verbrauchen 6,35 ccm Permanganat = 22,1 mg Ū. 20 ccm desselben Filtrats, nach *Kjeldahl* verarbeitet, verbrauchen 2,7 ccm n/5 HCl = 21,9 mg Ū.

I. Versuche mit $NaHCO_3$.

Um Störungen durch nachträgliches Ausfallen von Natriumbiurat zu vermeiden, wurden zunächst schwächere Lösungen von $NaHCO_3$ (n/20 bis n/400) benutzt. Erst bei Verwendung von n/10 Lösungen fiel öfters harnsaures Natron innerhalb der zur Beendigung der Versuche notwendigen Zeit aus, so daß damit die Grenze der Versuchsmöglichkeit gegeben war. Ein mit Sicherheit als Rückgang der Löslichkeit zu bezeichnendes Verhalten des gelösten harnsauren Natriums wurde unter den von uns innegehaltenen Bedingungen nicht beobachtet; es fanden sich zwar für ein und dieselbe Konzentration an $NaHCO_3$ bei gleicher Schütteldauer manchmal verschiedene Werte und bei längerer Schütteldauer manchmal geringere Werte als bei kürzerer, jedoch waren diese Abweichungen nicht erheblich und sind aus kleinen unvermeidlichen Verschiebungen der Versuchsbedingungen erklärlich, von denen später noch die Rede sein wird. Nun soll die Ausführung eines Versuchs beschrieben und die übrigen nur in tabellarischer Anordnung mitgeteilt werden.

Je 100 ccm einer n/50, n/100, n/200, n/400 Lösung von $NaHCO_3$ wurden in Glasflaschen von genau 300 ccm Rauminhalt rasch mit 0,2 g Ū beschickt, luftdicht mit gut passenden, eventuell eingefetteten Glasstöpseln verschlossen, 1½ Stunden geschüttelt, dann vorsichtig dem Schüttelapparat entnommen und bis zum völligen Absitzen der ungelöst gebliebenen Ū stehengelassen (Dauer meist 1 bis 2 Stunden). Nachher wurde eine kleine Menge der über dem Bodensatz stehenden klaren oder nur feinstaubig getrübten Flüssigkeit in ein Becherglas abgegossen, aus diesem filtriert und eine abgemessene Menge des Filtrats mit Permanganat titriert.

---

[1]) Der Zusatz von Manganosulfat erfolgte hier wie in den anderen mit Mineralwasser angestellten Versuchen zur Unschädlichmachung des vorhandenen Cl′, das die Titration stören würde.

(Die mitgeteilten Zahlen sind Mittelwerte aus mindestens zwei fast immer völlig übereinstimmenden Werten).

Es wurden so erhalten:

1. n/50 $NaHCO_3$: 10 ccm Filtrat + 40 ccm H_2O
   + 10 ccm H_2SO_4 verbrauchen 3,125 ccm P . = 112,8 mg-% Ū
2. n/100 $NaHCO_3$: 10 ccm Filtrat + 40 ccm H_2O
   + 10 ccm H_2SO_4 verbrauchen 2,05 ccm P . = 74 „ Ū
3. n/200 $NaHCO_3$: 20 ccm Filtrat + 30 ccm H_2O
   + 10 ccm H_2SO_4 verbrauchen 2,7 ccm P . . = 48,7 „ Ū
4. n/400 $NaHCO_3$: 25 ccm Filtrat + 25 ccm H_2O
   + 10 ccm H_2SO_4 verbrauchen 2,2 ccm P . . = 32,5 „ Ū

In der Tabelle I findet sich eine Übersicht über eine Anzahl ähnlicher Versuche; die in einem senkrechtem Stabe angeführten Werte entstammen demselben Schüttelversuch, und nur diese Werte sind direkt untereinander vergleichbar.

Es sei nun gleich die Wiedergabe einer mit konzentrierterer Lösung von $NaHCO_3$ ausgeführten Versuchsreihe angeschlossen (Tabelle II).

Die Betrachtung dieser Tabellen lehrt, wieweit die erhaltenen Harnsäurewerte hinter den theoretisch möglichen zurückbleiben und, was noch auffallender ist, daß bei Verdünnungen der Ausgangslösung im Verhältnis 2, 4, 8, die bei diesen Verdünnungen gefundenen Harnsäurewerte keineswegs dem Ausmaße der Verdünnungen parallel gehen. Es läßt sich unschwer erkennen, daß zwischen den erhaltenen Werten — mit kleinen, durch Versuchsfehler bedingten Abweichungen — ein gewisses Zahlenverhältnis besteht, und zwar das einer geometrischen Progression mit dem Quotienten 2/3 oder sehr angenähert 2/3. Wie bereits erwähnt, können für diese Berechnung nur die Werte einer gleichzeitig unter denselben Umständen ausgeführten Versuchsreihe in Betracht gezogen werden, da trotz gleicher Schüttelzeit kleine unvermeidliche Differenzen in der Temperatur, im Gange des Motors usw. die erhaltenen Werte stark beeinflussen. Versuche 1, 2 und 3, in denen bei einer Schüttelzeit von 1 Stunde die Salzbildung keine maximale ist, lassen das gegenseitige Verhältnis der einzelnen Werte als Glieder einer geometrischen Progression ebensogut erkennen, wie die anderen Versuche, in denen das Maximum der Uratbildung zum Ausdruck kommt. So stimmen im Versuch 1 die gefundenen Werte fast genau mit den berechneten überein ($90 . 2/3 = 60$, $60 . 2/3 = 40$, $40 . 2/3 = 26,6$). Ebenso in Versuchen 2 und 3 und in den übrigen Versuchen würde die Berechnung für einen mittleren Ausgangswert von n/50 = 112 ergeben: $112 . 2/3 = 74,66$, $112 . (2/3)^2 = 49,7$, $112 . (2/3)^2 = 33,1$, Werte, die den gefundenen sehr nahe liegen. Auch in der mit n/20

Tabelle I.

Rauminhalt d. Schüttelflasche	100 ccm $NaHCO_3$	Millimol	Prozentgehalt	Zugesetzte Harnsäure	mg Harnsäure in Lösung (als Mononatriumurat)							Theoretischer Harnsäurewert	Unterdrückte Harnsäure, berechnet f. d. Ausgangswert n/50 = 112 mg
					Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6	Versuch 7		
					Schütteldauer								
ccm				g	1 Std.	1 Std.	1 Std.	1 1/2 Std.	1 1/2 Std.	2 1/2 Std.	2 1/4 Std.		
300	n/50	2	0,168	0,2	90	94,5	90,3	112,8	111,9	114		336	224
300	n/100	1	0,084	0,2	60,6	62,8		74	74	75,8	74,2	168	93,3
300	n/200	1/2	0,042	0,2	39,7		40,4	48,7		46,2		84	34,2
300	n/400	1/4	0,021	0,2	26,0			32,5		33,2		42	8,82

Tabelle II.

Rauminhalt der Schüttelflasche	100 ccm $NaHCO_3$	Millimol	Prozentgehalt	Zugesetzte Harnsäure	mg Harnsäure in Lösung					Theoretischer Harnsäurewert	Unterdrückte Harnsäure
					Versuch 8	Versuch 9	Versuch 10	Versuch 11	Versuch 12		
					Schütteldauer						
ccm				g	2 Std.	2 Std.	1 3/4 Std.	2 Std.	1 1/2 Std.		
300	n/20	5	0,42	0,4	187,7	176,9	194	198	187,7	840	651
300	n/40	5/2	0,21	0,2	126,3	120,9				420	294
300	n/80	5/4	0,105	0,2	84	79,4				210	126
300	n/160	5/8	0,0525	0,2	55,9					105	49

Bicarbonat ausgeführten Versuchsreihe stimmen die berechneten Werte befriedigend, wenn statt des gefundenen Wertes von 187,7 ein etwas höherer gesetzt wird, der wohl auch nach dem Ausfall der Versuche 10 und 11 an Wahrscheinlichkeit gewinnt ($189 \cdot 2/3 = 126$, $189 \cdot (2/3)^2 = 84$, $189 \cdot (2/3)^3 = 56$). Für Versuch 9 ergibt die Berechnung in umgekehrter Reihenfolge $79{,}4 \cdot 3/2 = 119$ (gef. 120,9), $79{,}4 \cdot 9/4 = 178{,}5$ (gef. 176,9). Die in verschiedenen Versuchen bei n/20 Bicarbonat gefundenen Harnsäurewerte zeigen trotz gleicher Versuchsbedingungen keine gute Übereinstimmung. Dies mag, außer den bereits oben erwähnten Ursachen, darin begründet sein, daß bei der relativ starken Konzentration an Bicarbonat bereits kleine in verschiedenen Versuchen variierende Verluste von Kohlensäure bei der Harnsäurebestimmung eine merkliche Rolle spielen.

Was nun das Zurückbleiben der gefundenen Harnsäurewerte gegen die theoretisch möglichen trifft, so sieht man aus den Versuchen 4, 5 und 6, daß bei n/50 etwa 33 %, bei n/100 44 %, bei n/400 78 % der theoretisch möglichen Harnsäure gebildet werden, also mit fallender Konzentration dem theoretischen Werte sich nähern und umgekehrt mit steigender Konzentration die Harnsäurebildung zwar zunimmt, die unterdrückte Harnsäure aber in größerem Umfange wächst; besonders deutlich geht dies aus Versuchen 8 und 9 hervor, in dem bei n/160 Bicarbonat etwa die Hälfte, bei n/20 etwas weniger als der vierte Teil der theoretischen Salzbildung erreicht wird. Ordnet man die gefundenen Harnsäurewerte in Form einer Kurve an, in der die Konzentrationen an Bicarbonat als Ordinaten, die Harnsäurewerte als Abszissen aufgetragen werden, so erhält man eine Exponentialkurve, die mit sehr geringer Krümmung gegen die Ordinatenachse konkav und steil in immer größerem Abstande von der Abszissenachse nach aufwärts verläuft, d. h. mit *zunehmender Konzentration wächst die „unterdrückte“ Harnsäure in viel stärkerem Maße als die gebildete.* Werden die Logarithmen der Konzentration an Bicarbonat und der Harnsäurewerte in ähnlicher Weise zu einer Kurve angeordnet, so erhält man eine gerade Linie.

Dies läßt sich auch mathematisch leicht erweisen. Sind y die Ordinaten der in geometrischer Progression *ansteigenden* Konzentration der Bicarbonatlösung, so ist die allgemeine Gleichung derselben $y = b \cdot p^n$, wenn b den Anfangswert der Konzentration, p den Quotienten der geometrischen Progression (in unserem speziellen Falle = 2) bedeutet; andererseits lautet dann die Gleichung der erhaltenen Harnsäurewerte als Abszisse $x = a \cdot q^n$, worin a dem für die Konzentration b gefundenen Harnsäurewert und q dem Quotienten der Progression der Harnsäurewerte entspricht (in unserem Falle = 3/2). Werden beide Gleichungen logarithmiert und der aus der ersten Gleichung erhaltene Wert für n in die zweite eingesetzt, so erhält man die Gleichung

$$\log y = \frac{\log p}{\log q} \log x - \frac{\log p}{\log q} \log a + \log b,$$

also die Gleichung einer logarithmischen Linie, deren Neigungswinke gegen die Abszissenachse durch $\operatorname{tg} \alpha = \frac{\log p}{\log q}$ bestimmt ist[1]). Die Gleichung der dieser logarithmischen Linie entsprechenden Exponentialkurve würde lauten $y = b\left(\frac{x}{a}\right)^{\frac{\log p}{\log q}}$. Wie später ausgeführt wird, gilt diese Gleichung nur innerhalb eines begrenzten Konzentrationsbereiches; bei ganz geringen Konzentrationen erfolgt nämlich eine Salzbildung, die genau der berechneten entspricht; innerhalb dieser Zone entsprechen die Harnsäurewerte einer geraden Linie, p wird gleich q und die Exponentialgleichung geht über in die Scheitelgleichung einer Geraden $y = \frac{b}{a} x$. Die Kurve der Harnsäurewerte beginnt daher für die niedrigsten Konzentrationen mit einer Geraden, die dann allmählich — etwa von der Konzentration n/450 an — in die obenerwähnte Kurve eines gestreckt verlaufenden parabelähnlichen Armes übergeht; die Kurve hat also keinen stetigen Charakter; ihr Endpunkt ist durch die Grenze der Löslichkeit des Natriumbiurats gegeben.

Bevor die Ursachen dieser auffallend geringen Salzbildung besprochen werden, seien noch die Resultate einer weiteren Versuchsreihe angeführt, in denen andere Konzentrationen von Bicarbonat, und zwar in fortschreitender Drittelverdünnung, benutzt wurden. Die erhaltenen Resultate veranschaulicht die Tabelle III.

Auch hier zeigt sich deutlich das Zurückbleiben der bei den höheren Bicarbonatkonzentrationen erhaltenen Werte gegenüber den theoretisch geforderten; das gegenseitige Verhältnis dieser Werte ist aber zunächst nicht so durchsichtig, wie in den Tabellen I und II. Bei den hier benutzten Konzentrationen an Bicarbonat erfolgt nämlich zum Teil eine vollständige Salzbildung, also Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert, zum Teil findet in einzelnen der darauf folgenden Konzentrationen innerhalb einer gewissen Zone ein allmählicher Übergang statt zu einer Gesetzmäßigkeit, die erst in den Konzentrationen über n/450 zum Ausdruck kommt. So entsprechen die in den Versuchen 13, 14, 15 bei n/1350 $NaHCO_3$ gebildeten Harnsäuremengen genau der theoretischen Menge, in Versuch 17 bei n/900 $NaHCO_3$ nahezu der berechneten Menge, so daß also in dem Gebiete zwischen n/1350 bis n/900 $NaHCO_3$ die Salzbildung eine ungehemmte ist, das heißt in diesem Bereiche erfolgt bei Zunahme der Konzentrationen auf das Dreifache auch eine Zunahme der Harnsäurebildung auf das Dreifache; in den dann etwa bis n/450 reichenden Konzentrationen nimmt die Harnsäurebildung *allmählich* ab, indem der Quotient 3 allmählich niedriger wird, um dann

[1]) Durch Einsetzen der entsprechenden Werte ($b = 84$, $p = 2$, $a = 74{,}6$, $q = 3/2$) erhält man als Gleichung dieser Linie (für das Schüttelvolumen 300 ccm):

$$\log y = 1{,}7095 \log x - 1{,}27786.$$

Tabelle III.

Rauminh. d. Schüttelfl.	100 ccm $NaHCO_3$	Millimol	Prozentgehalt	Zugesetzte Harnsäure	mg Harnsäure in Lösung				Theoretischer Harnsäurewert	Unterdrückte Harnsäure
					Vers. 13	Versuch 14		Vers. 15		
					Schütteldauer					
ccm				g	$1^3/_4$ Std.	$1^3/_4$ Std.	$1^3/_4$ Std.	1 Std.		
						Permanganat	*Kjeldahl*			
300	n/50	2	0,168	0,2	111,0	113,7	115,5	97,8	336	224
300	n/150	$^2/_3$	0,056	0,2	58	59,2	59,6	51,2	112	53
300	n/450	$^2/_9$	0,0186	0,2	28,9	27,1	28,4	25,2	37,3	8,8
300	n/1350	$^2/_{27}$	0,0062	0,2	12,6	14,5	13,0	12,3	12,44	0
					Vers. 16 Schütteldauer $1^1/_4$ Std.	Vers. 17 Schütteldauer $1^3/_4$ Std.				
300	n/100	1	0,084	0,2	72,2				168	95
300	n/300	$^1/_3$	0,028	0,2		38,6			56	17,4
300	n/900	$^1/_9$	0,0093	0,2	17,3				18,66	0,7-1,3
					Vers. 18 Schütteldauer $1^3/_4$ Std.	Vers. 19 Schütteldauer $1^3/_4$ Std.				
300	n/10	10	0,84	0,4	285	283			1680	1395
300	n/30	$^{10}/_3$	0,28	0,2	150,5				560	410
300	n/90	$^{10}/_9$	0,093	0,2	80				186,6	106
300	n/270	$^{10}/_{27}$	0,031	0,2	39,7				62,2	22
					Vers. 20 Schütteldauer $1^1/_4$ Std.	Vers. 21 Schütteldauer 2 Std.	Vers. 22 Schütteldauer $1^3/_4$ Std.			
300	n/20	5	0,42	0,4	187,7	198	191		840	651
300	n/60	$^5/_3$	0,14	0,2	101,0	104,9	101,9		280	179
300	n/180	$^5/_9$	0,046	0,2	52,4	52,4			93,3	41
300	n/540	$^5/_{27}$	0,015	0,2	*)	25,3			31,1	5,8

*) Verunglückt.

schließlich im Gebiet von etwa n/450 nach aufwärts die konstante Größe von 1,9015 anzunehmen. Ordnet man die nun bei $(1/3)^n$ Konzentration gefundenen Werte wieder in eine Kurve an, so findet man, daß sie von der angegebenen Konzentration n/450 angefangen genau in die früher bei $(1/2)^n$ Konzentration erhaltenen Kurve fallen[1]). So ergibt die Berechnung in Versuchen 18 und 19 für den Ausgangswert n/10 $NaHCO_3$ = 285, für n/30 = 149,9 (gef. 150,5), für n/90 = 78,8

[1]) Daher gilt auch für diese Kurve die dort ermittelte Gleichung, und es läßt sich aus dieser der Quotient der geometrischen Progression berechnen, den die bei den Drittelkonzentrationen erhaltenen Harnsäurewerte bilden. Da die Kurven und daher ihr Neigungswinkel identisch sind, folgt aus $\operatorname{tg} \alpha = \frac{\log p}{\log q}$ die Gleichung $\frac{\log 2}{\log \frac{3}{2}} = \frac{\log 3}{\log x}$; woraus sich x zu 1,9015 (für die aufsteigende Konzentration, $\frac{1}{1,9015} = 0,5259$ für die fallende Konzentration) berechnet.

(gef. 80,0), für n/270 = 41,4 (gef. 39,7), in Versuchen 20, 21 und 22 für n/60 = $187{,}7 \cdot \frac{1}{1{,}9015} = 99$ (gef. 101,0), für n/180 = $187{,}7 \left(\frac{1}{1{,}9015}\right)^2 = 51{,}9$ (gef. 52,4). Der nächste Wert für n/450 fällt bereits außerhalb des Geltungsbereichs der geometrischen Progression. Er liegt, wie im vorhergehenden erwähnt, schon in jener Konzentrationszone, die den Übergang zur vollständigen Salzbildung bildet. Aus dem Vergleich der Versuche 16 und 17 würde sich für n/300 $NaHCO_3$ berechnen aus $72{,}2 \cdot \frac{1}{1{,}9015} = 37{,}9$ (gef. 38,6), während aus dem Durchschnittswert (Versuche 4, 5, 6) für n/100 = 74,6 sich für n/300 = 38,6 ergibt. Der Wert für n/900 fällt wieder ganz nahe in die Zone der vollständigen Salzbildung, scheidet also aus der Berechnung aus.

In den beiden nun angeführten Versuchsreihen von verschiedenen Konzentrationen an Bicarbonat zeigt sich also *übereinstimmend ein erhebliches Zurückbleiben der erhaltenen hinter den theoretisch zu erwartenden Werten; gegenüber der Menge der „unterdrückten" Ū nimmt die Menge der gebildeten Harnsäure in viel geringerem Maße zu, und außerdem zeigt sie innerhalb einer bestimmten Grenze eine auffallende Gesetzmäßigkeit.* Die Ursache der unvollständigen Salzbildung kann offenbar nur in dem Gehalt an CO_2 gesucht werden, die bei der Salzbildung sich entwickelt. Um diesen Einfluß der CO_2 auf die Hemmung der Uratbildung einwandsfrei zu erweisen, wurde die Uratbildung untersucht:

1. bei verschieden großer Anreicherung der Lösung an CO_2,
2. bei Änderung des über der Flüssigkeit stehenden Luftvolumens bei gleichbleibendem (Neutralisations-) CO_2-Gehalt und
3. nach Entfernung der bei der Salzbildung auftretenden CO_2.

Versuche zu 1. Versuch 23. Eine n/50 Bicarbonatlösung wurde mit CO_2 behandelt und aus dieser Lösung durch Verdünnen mit Wasser die Verdünnungen von n/100, n/200, n/400 hergestellt. Die Verdünnung wurde unter möglichster Vermeidung eines CO_2-Verlustes vorgenommen; die Abmessung geschah in der Weise, daß die abzumessende kohlensäurehaltige Lösung durch eine entsprechende Vorrichtung von unten in die Pipette gedrückt wurde; das Ablaufenlassen der abgemessenen Flüssigkeit erfolgte stets langsam unter das Niveau der Verdünnungsflüssigkeit. Die Bestimmung des CO_2-Gehalts in der n/50 Lösung (nach *Winkler*) ergab 154 mg-% CO_2.

Versuch 24 wurde in gleicher Weise angestellt, nur wurde den Lösungen ein geringerer CO_2-Gehalt erteilt, indem die in Versuchsnummer 23 benutzte Ausgangslösung (mit CO_2 behandelte n/50 $NaHCO_3$-Lösung) mit n/50 (CO_2-freier) Bicarbonatlösung verdünnt wurde. Die Bestimmung der CO_2 in dieser neuen Ausgangslösung ergab *22 mg-%*. Die Verdünnungen wurden wie in Versuch 23 hergestellt. Der Ū-Zusatz betrug bei jeder Probe in beiden Versuchen 0,2 g, die Schütteldauer 1 Stunde. Das Ergebnis beider Versuche folgt in Tabelle IV.

Tabelle IV.

100 ccm $NaHCO_3$	Versuch 23: Zugesetzte Harnsäure	Versuch 23: Zugesetzte CO_2 mg	Versuch 23: Zugesetzte + Neutralisations-CO_2	Versuch 23: Gefundene Harnsäure mg	Versuch 24: Zugesetzte CO_2 mg	Versuch 24: Zugesetzte + Neutralisations-CO_2	Versuch 24: Gefundene Harnsäure	Nach einstünd. Schütteln zu erwartende Harnsäure (s. Tabelle I)
n/50	0,2	154	154 + 5,3 = 159,3	20,2	22	22 + 14,17 = 36,17	54,1	90
n/100	0,2	77	77 + 4 6 = 81,6	17,6	11	11 + 11,44 = 22,4	43,7	60
n/200	0,2	38,5	38,5 + 4,1 = 42,66	15,9	5,5	5,5 + 8,12 = 13,6	31,0	40
n/400	0,2	19,2	19,2 + 3,66 = 22,8	14	2,75	2,75 + 5,76 = 8,5	22	26

Diese Zahlen erweisen also deutlich, wie stark die Salzbildung unter CO_2-Zusatz herabgedrückt wird; bei Zusatz von 154 mg CO_2 werden von der n/50 Bicarbonatlösung fast 70 mg, und selbst bei n/400 mit einem CO_2-Gehalt von etwa 20 mg CO_2 werden noch 12 mg $\overline{U}$ unterdrückt. Tatsächlich dürfte die Differenz noch größer sein, denn bei Anwesenheit von so großen Mengen CO_2 ist wohl nach einstündiger Schüttelzeit bereits die maximale Menge von $\overline{U}$ gebildet, während hier zum Vergleich nur die nach einstündiger Schüttelzeit gebildeten „Normalwerte" herangezogen werden, welche nicht die Maximalwerte darstellen. Verringerung des CO_2-Zusatzes führt zu einer Vermehrung der Salzbildung; aber selbst bei einem so geringen anfänglichen CO_2-Gehalt von 2,7 mg, wie in Versuch 24 bei n/400 Konzentration, erfolgt noch eine Hemmung der Salzbildung um wenigstens 4 mg. In der Tabelle befindet sich auch die Berechnung der aus der Umsetzung des Bicarbonats mit der $\overline{U}$-frei werdenden CO_2. Die Summe aus dieser Neutralisations- und der zugesetzten CO_2 stellt die am Schluß des Versuchs tatsächlich vorhandene CO_2-Menge dar. Sie ist in Versuch 23 gegenüber der zugesetzten Menge unbeträchtlich, in Versuch 24 aber nicht unerheblich.

Die Betrachtung der in Versuch 23 erhaltenen Harnsäurewerte läßt die auffallende Tatsache erkennen, daß dieselben bei starker Abnahme der Bicarbonat- sowie der CO_2-Konzentration nur eine geringfügige Abnahme zeigen. Bei fortgesetztem Sinken der Konzentration an Bicarbonat + CO_2 um die Hälfte beträgt die Abnahme fast regelmäßig nur 2 mg. Dies rührt wahrscheinlich daher, daß bei Anwesenheit großer Mengen CO_2 die Konzentration an Bicarbonat nur eine geringe Rolle spielt gegenüber der in den Verdünnungen annähernd gleichbleibenden $H^{\cdot}$-Konzentration, deren große Bedeutung für die Löslichkeit

der $\bar{U}$, besonders in der Nähe des Neutralpunktes, von *Jung*[1]) dargelegt wurde. Bei Anwesenheit geringer CO_2-Mengen, wie etwa in Versuch 24, prägt sich diese Erscheinung weniger deutlich aus, reicht aber noch hin, um das früher konstatierte $(2/3)^n$-Verhältnis im Sinne einer Erhöhung dieses Quotienten zu beeinflussen; die Verminderung der $\bar{U}$-Werte gegenüber den ohne CO_2-Zusatz erhaltenen Werten tritt aber noch sehr deutlich in Erscheinung. Auch in einem mit stark CO_2-haltigem Mineralwasser ausgeführten Lösungsversuche kam diese relativ geringe Abnahme der Harnsäurewerte bei starker Abnahme der Konzentration des Lösungsmittels zur Beobachtung.

Versuch 25. 100 ccm Parkquelle, die frisch dem Brunnen unter Verhütung von CO_2-Verlust entnommen war, wurden gleichzeitig mit je 100 ccm der ½- und ¼-Verdünnung unter Zusatz von 0,2 g $\bar{U}$ 1 Stunde geschüttelt. Der CO_2-Gehalt der frischen Parkquelle betrug 96,5 mg-%, ihr $NaHCO_3$-Gehalt entspricht einer etwa n/40 Lösung. p_H für alle drei Lösungen = 6,689 (bestimmt nach der *Michaelis*schen Indikatorenmethode).

1. 100 ccm Parkquelle + 0,2 g U^- bilden 40,0 mg-% $\bar{U}$
2. 50 „ „ + 50 H_2O + 0,2 g $\bar{U}$ bilden 35,37 mg-% $\bar{U}$
3. 25 „ „ + 75 H_2O + 0,2 g $\bar{U}$ bilden 31,0 „ $\bar{U}$

Also findet sich auch hier unter Einwirkung des starken CO_2-Gehalts bei Abnahme der Konzentration in geometrischer Reihe eine nur relativ geringe, anscheinend lineare Abnahme der Salzbildung. Zusatz von Kohlensäure bis zur Grenze ihrer Aufnahme in Wasser, also Sättigung der Lösung mit CO_2, führt zu einer weiteren Verringerung der bisher erhaltenen Harnsäurewerte; so ergab eine n/50 Bicarbonatlösung, die mit CO_2 gesättigt und 2 Stunden in einer 300 ccm-Flasche mit 0,2 g $\bar{U}$ geschüttelt wurde, einen $\bar{U}$-Gehalt von 11,9 mg[2]) (gegen

---

[1]) *A. Jung*, Helvetica chimica Acta **5**, 5.

[2]) Damit, d. h., daß auch bei Sättigung mit CO_2 noch immer etwas Harnsäure gelöst wird, steht in Übereinstimmung, daß Kohlensäure aus Lösungen von Harnsäure in Bicarbonat (und Carbonat) die Harnsäure nicht vollständig ausfällt. Wurde Harnsäure in n/50 Bicarbonat gelöst, genügend lange CO_2 in die Lösung eingeleitet und von der ausgeschiedenen $\bar{U}$ abfiltriert, so fanden sich im Filtrat in verschiedenen Versuchen 16 bis 14, in n/100 Lösungen, die in derselben Weise behandelt wurden, 13 bis 11 mg, in n/20 Lösungen 30 bis 24 mg $\bar{U}$. Wird die eingeleitete CO_2 unter Druck gesetzt, so erfolgt die Fällung der Harnsäure rascher und in etwas größerem Ausmaß, aber nicht vollständig. Daß die CO_2 trotz ihrer kleineren Dissoziationskonstante ($= 3{,}04 \,.\, 10^{-7}$) Harnsäure (Dissoziationskonstante + $= 1{,}5 \,.\, 10^{-6}$) aus Bicarbonat- und Carbonatlösungen fällt, beruht ja darauf, daß die Löslichkeit der CO_2 (1 g CO_2 löst sich in ungefähr 0,5 Liter, 1 g $\bar{U}$ in 39 Liter H_2O) in Wasser so viel größer ist als die der $\bar{U}$; daher kann sich die Zahl der $H^{\cdot}$ durch CO_2-Zufuhr soweit anhäufen, um im Verein mit den überschüssig vorhandenen Urationen die Dissoziation der Harnsäure bis zur Überschreitung des Löslichkeitsproduktes zurückzudrängen.

112 mg einer unter gleichen Verhältnissen behandelten, aber nur die Neutralisations-CO_2 enthaltenden n/50 Bicarbonatlösung).

Die Wirkung kleiner CO_2-Mengen bei gleichbleibender Konzentration an $NaHCO_3$ veranschaulicht der folgende Versuch:

Versuch 26. In 100 ccm n/50 Bicarbonatlösung wird längere Zeit CO_2 eingeleitet. Diese Lösung wird mit n/50 CO_2-freier $NaHCO_3$-Lösung auf 500 ccm gebracht (CO_2-Gehalt = 11 mg-%); je 50, 25 und 12,5 ccm dieser CO_2-haltigen Bicarbonatlösung werden nach Auffüllung mit 50, 75 und 87,5 ccm n/50 CO_2-freier Bicarbonatlösung auf 100 ccm mit 0,2 g $\bar{U}$ versetzt und 1 Stunde lang geschüttelt.

1. 100 ccm n/50 $NaHCO_3$ mit 11 mg CO_2 liefern 70,03 mg $\bar{U}$
2. 100 „ n/50 $NaHCO_3$ „ 5,5 „ CO_2 „ 78,6 „ $\bar{U}$
3. 100 „ n/50 $NaHCO_3$ „ 2,75 „ CO_2 „ 83,75 „ $\bar{U}$
4. 100 „ n/50 $NaHCO_3$ „ 1,3 „ CO_2 „ 85,9 „ $\bar{U}$

Da ohne Zusatz von CO_2 von n/50 $NaHCO_3$-Lösung in einer Stunde etwa 90 mg $\bar{U}$ in Form von Natriumbiurat gebildet werden, so erhellt aus dem Versuche, wie selbst kleine Mengen zugesetzter CO_2 hemmend auf die Salzbildung wirken und umgekehrt bei geringfügiger Abnahme des CO_2-Gehalts die Harnsäurewerte deutlich ansteigen. Die Versuche 23 bis 26 erweisen also mit Sicherheit, *daß die Menge der vorhandenen CO_2 von ausschlaggebender Bedeutung ist für die Menge des in seiner Bildung gehemmten Natriumurats.*

Versuche zu 2. In den bisherigen Versuchen wurde die Änderung des CO_2-Gehalts ohne Rücksicht auf die durch die Salzbildung frei gewordene CO_2 durchgeführt, weil die Werte mit jenen verglichen werden sollten, die bei Gegenwart der Neutralisations-CO_2 erhalten worden waren. Nun soll der Einfluß der CO_2 auf die Salzbildung an diesem Anteil der CO_2 untersucht werden.

Hier galt es zunächst, festzustellen, ob das Volumen des über der Schüttelflüssigkeit befindlichen Luftraums einen Einfluß auf die Größe der Salzbildung ausübt; denn es war zu erwarten, daß die beim Schütteln stattfindende Verteilung zwischen absorbierter und freier CO_2, die auch vom Druck abhängig ist, bei Veränderung des Volumens eine Änderung erfährt, mithin das sich einstellende Gleichgewicht zwischen Druck, absorbierter und freier CO_2 von der Größe des Schüttelvolumens abhängig ist. Es wurden daher Lösungen von Bicarbonat in Glasflaschen verschiedenen Rauminhalts mit 0,2 g $\bar{U}$ geschüttelt. Über die erhaltenen Resultate orientiert die Tabelle V.

Der Erwartung entsprechend, wächst die Salzbildung mit der Größe des über dem Flüssigkeitsniveau vorhandenen Luftvolumens. Daß diese Zunahme durch einen bei größerem Inhaltsraum wirksameren Effekt des Schüttelprozesses bedingt sei, ist von vornherein unwahrscheinlich, da sonst längere Schütteldauer zu größeren Werten und bei

Tabelle V.

100 ccm $NaHCO_3$	Luftvolumen 50 ccm, Rauminhalt der Flasche 150 ccm		Luftvolumen 100 ccm, Rauminhalt der Flasche 200 ccm					Luftvolumen 200 cm³ Rauminhalt 300 cm³	Luftvolumen 400 ccm, Rauminhalt der Flasche 500 ccm			Luftvolumen 900 ccm, Rauminhalt der Flasche 1000 ccm		
	Versuch 27	Versuch 28	Versuch 29	Versuch 30	Versuch 31	Versuch 32	Versuch 33		Versuch 34	Versuch 35	Versuch 36	Versuch 37	Versuch 38	Versuch 39
	Schütteldauer		Schütteldauer						Schütteldauer			Schütteldauer		
	2 Std.	2 Std.	1 1/2 Std.	4 Std.	4 Std.	3 Std.	2 1/4 Std.		3 Std.	1 Std.	1 Std.	2 Std.	3 Std.	3 Std.
	Harnsäure		Harnsäure						Harnsäure			Harnsäure		
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg		mg	mg	mg	mg	mg	mg
n/50	88,4	88,4	108	101	102			112,8	136,2		137,1	168	168	180
n/100		61,3	72	66	68		66,7	74,7	88	88,4	89,3	104,7	97,4	113
				2 Std.										
n/200				45		42,4		48,7						
n/400				29,9		28,3		32						
	Versuch 40	Versuch 41						Versuch 8						
n/20	139							186						
n/40	93,8							126,3						
n/80		64,9						84						
n/160		43,3						55,9						

kleinem Volumen zu denselben Werten wie bei größeren Volumen mit geringerer Schütteldauer führen müßte, was nicht der Fall ist. (n/100 $NaHCO_3$ ergab in 200-ccm-Flaschen bei vierstündigem Schütteln dieselben Werte wie bei $2^1/_4$stündigem, n/50 in 500-ccm-Flaschen denselben Wert nach ein- wie nach dreistündigem Schütteln usw.) Eine gewisse Gesetzmäßigkeit in der Zunahme der Salzbildung ist beim Anwachsen des Luftvolumens unverkennbar. So wächst bei n/50 Bicarbonat und einem Luftvolumen von 50 ccm die Salzbildung bei Zunahme des Luftvolumens auf 100 ccm um etwa 12 mg, auf 200 ccm um 24 mg, auf 400 ccm um 36 mg, ferner stehen auch die von n/50 bis n/400 Bicarbonat bei demselben Luftvolumen gebildeten Harnsäuremengen in dem Verhältnis von 2 : 3 (wie dies früher für Tabelle II ausgeführt wurde); nur bei den Luftvolumen von 900 ccm, das im Verhältnis zur vorhandenen Flüssigkeitsmenge schon sehr groß ist, ist dieses Verhältnis nicht mehr vorhanden. Hier schwanken aber auch schon die in verschiedenen Versuchen unter denselben Bedingungen erhaltenen $\overline{U}$-Werte (Versuche 37, 38, 39), wahrscheinlich weil sich bei dem großen Volumen und dem geringen CO_2-Druck ein stabiles Gleichgewicht zwischen absorbierter und freier CO_2 nicht mehr herstellt. Etwas außerhalb der Reihe fallen die in Versuch 29 erhaltenen Werte (108 und 72 mg). Sie sind wesentlich größer als die selbst bei längerer Schütteldauer unter sonst gleichen Bedingungen gefundenen Werte und dürften wohl auf einen Versuchsfehler zurückzuführen sein (größere Schüttelflasche ?). In den Versuchen mit n/20 Bicarbonat und dessen Verdünnungen ist die wesentliche Zunahme der Salzbildung bei Vergrößerung des Luftvolumens besonders deutlich. Zur Ergänzung der hier angeführten Versuche sei noch ein weiterer mitgeteilt, in dem n/100 $NaHCO_3$ gleichzeitig in Flaschen von 200, 300 und 500 ccm mit 0,2 g $\overline{U}$ $2^1/_4$ Stunden geschüttelt wurden. (In der Tabelle V beziehen sich nur die in einer senkrechten Kolumne aufgeführten Werte auf *gleichzeitig* ausgeführte Versuche.)

Versuch 42.

100 ccm n/100 Bicarbonat in Flaschen von 200 ccm Inhalt (Luftvolumen 100 ccm) ergaben 66,7 mg $\overline{U}$.
100 ccm n/100 Bicarbonat in Flaschen von 300 ccm Inhalt (Luftvolumen 200 ccm) ergaben 74,7 mg $\overline{U}$.
100 ccm n/100 Bicarbonat in Flaschen von 500 ccm Inhalt (Luftvolumen 400 ccm) ergaben 90,7 mg U.

Hier ist also unter genau gleichen Bedingungen die Zunahme der Salzbildung bei Zunahme des Luftvolumens sehr deutlich ausgesprochen, und zwar beträgt sie bei Zunahme des Luftvolumens auf das Doppelte 8 mg, bei Zunahme des Luftvolumens auf das Vierfache 16 mg.

Betrachtet man die Werte für den Anteil der Harnsäure, der durch die Gegenwart der CO_2 nicht in harnsaures Salz umgewandelt wird und der kurz „unterdrückte" Harnsäure genannt sei, so ist die Größe desselben besonders in den hohen Bicarbonatkonzentrationen sehr erheblich; er beträgt bei einem Schüttelvolumen von 300 ccm und einer Bicarbonatkonzentration von 10 Millimol (0,84 %) 1395 mg (gegenüber 285 mg $\bar{U}$ im gebildeten harnsauren Natrium), bei 5 Millimol (0,42 %) 651 mg (gegenüber 189 mg $\bar{U}$ im gebildeten harnsauren Natrium) und bei 2 Millimol (0,168 %) noch immer 224 mg (gegenüber 112 mg im gebildeten harnsauren Natrium). Wird mit diesen Zahlen die bei Beendigung des Versuchs, also nach maximaler Salzbildung vorhandene CO_2 verglichen, welche aus der gefundenen $\bar{U}$-Menge berechnet, sich für n/10 Bicarbonat zu 74,6 mg, für n/20 Bicarbonat zu 49,5, für n/50 Bicarbonat zu 29,3 mg CO_2 ergibt, so kann ein solch auffallend „saurer" Effekt der gebildeten CO_2-Menge nicht gut mit der gewöhnlich angenommenen *scheinbaren*[1]) Dissoziationskonstante der CO_2 in Einklang gebracht werden; wenigstens einem Teil der wirksamen CO_2 muß eine höhere, aller Wahrscheinlichkeit nach die *wahre*[2]) Dissoziationskonstante der CO_2 zukommen, welche von *Strohecker*[3]), *Thiel* und *Strohecker*[4]) zu 4,4 bis 5 . 10^{-4} gefunden wurde[5]).

Da die Reaktion $H_2CO_3 \rightleftarrows H_2O + CO_2$ nicht zu rasch verläuft, so kann die wahre Dissoziationskonstante der CO_2 überall dort in Frage kommen, wo CO_2 im status nasc. auftritt. Ein gewisser Druck, unter dem die CO_2 steht, scheint nach unseren Versuchen eben eine der Bedingungen darzustellen, welche das Auftreten der CO_2 mit ihrer wahren Dissoziationskonstante begünstigt. Ein rechnerischer Beweis läßt sich aus diesen Versuchen nicht erbringen, da bei dem labilen Gleichgewichtszustande, der beim Schütteln zwischen Druck, absorbierter und freier CO_2 besteht, der Anteil der einzelnen Komponenten sich der Bestimmung entzieht.

---

1) $\frac{[H^{\cdot}][HCO'_3]}{CO_2} = 3{,}04 \,.\, 10^{-7}$.

2) $\frac{[H^{\cdot}][HCO'_3]}{H_2CO_3} = 4{,}4 \,.\, 10^{-4}$.

3) Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel **31**, 121.

4) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **47**, 945.

5) Mit dieser Dissoziationskonstante erhält die CO_2 die ihrer Konstitution als Oxyameisensäure entsprechende Stellung in der Reihe der organischen Säuren. Sie macht auch in technischer Hinsicht die starken Korrosionswirkungen auf Metalle erklärlich, die denen der schwachen Mineralsäuren nicht nachstehen. In physiologischer Hinsicht ist ihre Bedeutung noch nicht entsprechend untersucht. Nach *Höber* ist die wahre Dissoziationskonstante der CO_2 beim ersten Entstehen der CO_2 im Organismus in Erwägung zu ziehen.

Herabsetzung oder Erhöhung des CO_2-Druckes bewirkte also [genau so wie in der zu 1) angeführten Versuchsreihe *Abnahme* oder *Zunahme* der CO_2-Menge] *Vermehrung oder Verminderung der Salzbildung, die innerhalb gewisser Grenzen der Veränderung des Luftvolumens direkt und geradlinig proportional ist. Dabei kommt ein Teil der unter Druck sich entwickelnden CO_2 — wie dies auch die Versuche 1 bis 22 zeigen — höchstwahrscheinlich mit ihrer wahren Dissoziationskonstante zur Wirkung.*

Versuche zu 3. Dieselben wurden in der Weise ausgeführt, daß die Bicarbonatlösungen mit 0,2 g $\overline{\text{U}}$ in Flaschen geschüttelt wurden, die das Entweichen der CO_2 leicht gestatteten. Über die $\overline{\text{U}}$-Werte, welche bei 1- bis $2\frac{1}{2}$stündigem Schütteln erhalten wurden, gibt die Tabelle VI Auskunft.

Tabelle VI.

100 ccm $NaHCO_3$	Vers. 43	Vers. 44	Vers. 45	Vers. 46	Vers. 47	Vers. 48	Vers. 49	Theoretischer Harnsäurewert
	Schütteldauer							
	1 Std.	$1^1/_4$ Std.	$1^1/_2$ Std.	$1^1/_2$ Std.	$1^1/_2$ Std.	2 Std.	$2^1/_2$ Std.	
	mg Harnsäure im gelösten Natriumbiurat							
n/50	132	135	184	190		198	191	336
n/100	87	82	151	122	120	112	112	168
n/200	46	51	72	72			68	84
n/400	28	30	43		43		40	42

Dieselbe zeigt ohne weiteres, daß zwar unter den jetzt gewählten Bedingungen viel reichlichere $\overline{\text{U}}$-Bildung als beim Schütteln in geschlossenen Gefäßen erzielt wurde, daß aber nur bei der Konzentration von n/400 manchmal die theoretisch mögliche Menge von $\overline{\text{U}}$ erreicht wurde. Außerdem ist ein deutliches Schwanken der Werte innerhalb einer großen Breite erkennbar, die eben von der Geschwindigkeit abhängt, mit der die CO_2 entweicht und die nicht immer der Schüttelzeit proportional ist. So wurden für n/50 Bicarbonat bei $1^1/_4$- bis $1\frac{1}{2}$stündiger Schütteldauer wechselnde Werte von 120 bis 180 mg, bei 2- bis $2\frac{1}{2}$stündigem Schütteln 190 bis 198 mg erhalten, während 336 mg gebildet werden sollen; für n/100 unter den gleichen Bedingungen 112 bis 150 mg (theoretischer Wert 168 mg), für n/120 68 bis 72 mg (theoretischer Wert 84 mg) für n/400 40 bis 43 mg, also nur bei der letzten Konzentration wurde öfter der theoretisch geforderte Wert von 42 mg erreicht. Da die Versuchsbedingungen das Zustandekommen eines nennenswerten Druckes der CO_2 ausschließen, kann die unvollständige Salzbildung nur an dem Gehalt der Flüssigkeit an absorbierter CO_2 gelegen sein. Je geringer diese Menge, desto leichter wird sie beim Schütteln entfernt, daher nähern sich mit fallender Konzentration die erhaltenen Werte auch immer mehr denen der vollständigen Salzbildung.

Um nun die Reste der absorbierten CO_2 vollständig zu entfernen, wurde durch die Lösungen ein kräftiger Luftstrom geleitet und von Zeit zu Zeit eine Probe zur Bestimmung der $\overline{U}$ entnommen. Als Beispiel solcher Versuche seien folgende angeführt:

Versuch 50.

100 ccm n/200 $NaHCO_3$ und 0,2 g $\overline{U}$ werden in offener Flasche 2 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt, $\overline{U}$ - Gehalt 60 mg-%; durch einen anderen Teil desselben Filtrats wird ½ Stunde lang Luft durchgeleitet: $\overline{U}$ - Gehalt 70,3 mg-%; durch den Rest des Filtrats wird noch 1 Stunde Luft durchgeleitet: $\overline{U}$ - Gehalt 75,0 mg-% (theoretisch geforderter Wert 84 mg). Es wird also nach zweistündigem Schütteln und 1½stündigem Luftdurchleiten noch nicht der theoretische Wert erreicht.

Versuch 51.

100 ccm n/50 $NaHCO_3$ + 0,4 g $\overline{U}$

nach vierstündigem Luftdurchleiten	$\overline{U}$ - Gehalt	288,8 mg-%
„ einer weiteren Stunde	„	296,4 „
„ „ „ „	„	308,6 „
„ „ „ „	„	339,0 „

(theoretischer Wert 336 mg).

Also erst nach siebenstündigem Luftdurchleiten wurde der theoretische Wert erreicht. (Der etwas höher gefundene Wert ist wahrscheinlich die Folge der durch das lange dauernde Luftdurchleiten verursachten Einengung des Volumens.)

Versuch 52.

100 ccm n/100 $NaHCO_3$ + 0,2 g $\overline{U}$. Nach vierstündigem Luftdurchleiten wurden 42 mg, also der theoretisch verlangte Wert gefunden.

Das Ergebnis dieser Versuche erweist einerseits die Schwierigkeit, kleine Mengen absorbierter CO_2 vollständig aus einer Lösung zu entfernen, und andererseits den Einfluß, den selbst kleine Mengen gelöster CO_2 auf die Bildung der harnsauren Salze ausüben können.

Zusammenfassende Betrachtung der mitgeteilten drei Versuchsgruppen lehrt also übereinstimmend die Abhängigkeit der $\overline{U}$ - Löslichkeit bzw. ihrer Salzbildung von der Menge der freien CO_2, vom Druck derselben und von der Menge der absorbierten CO_2, wobei besonders bemerkenswert erscheint, daß auch sehr kleine Mengen von absorbierter, nicht unter Druck stehender CO_2 eine deutliche Hemmung der Salzbildung bewirken können.

II. Versuche mit Natriumcarbonat.

Die Versuche wurden in der bisher beschriebenen Weise ausgeführt und sind in ihrer Gesamtheit in der Tabelle VII vereinigt.

Als Durchschnittswert für den Rauminhalt der Schüttelflaschen von 300 ccm und die Konzentration n/50 . $(1/2)^n$ ist der Versuch 55

Tabelle VII.

100 ccm Na_2CO_3	Millimol	Prozentgehalt	Zugesetzte Harnsäure	Luftvol. 100 ccm, Flascheninhalt 200 ccm	Luftvolumen 200 ccm, Flascheninhalt 300 ccm						Luftvol. 400 ccm, Flascheninhalt 500 ccm	Theoret. Harnsäurewert	Unterdrückte Harnsäure
				Versuch 53	Versuch 54	Versuch 55	Versuch 56	Versuch 57	Versuch 57	Versuch 58	Versuch 59		
				Schütteldauer									
				3 Std.	2 Std.	2 Std.	3 Std.	$1^3/_4$ Std.		3 Std	3 Std.		
			g	mg Harnsäure									f. Vers. 55
n/50	1	0,1061	0,2	183,5	184	194,6	188	198	194	193,5	202,1	336	141,4
n/100	$^1/_2$	0,05305	0,2	104,6	104,7	111	107,39			110	**115,5**	168	57
n/200	$^1/_4$	0,0265	0,2			63,1	61,37			62	64,5	84	21
n/400	$^1/_8$	0,01325	0,2			36,1				36	36,8	42	6
					Versuch 60	Versuch 61							
n/50	1	0,1061	0,2		191,3	185,9						336	
n/150	$^1/_3$	0,03536	0,2		76,8	76,7						112	
n/450	$^1/_9$	0,01178	0,2		32,2	30,3						37,3	
n/1350	$^1/_{27}$	0,0039	0,2		14,2							12,4	
					Versuch 62	Versuch 63							
n/20	$^5/_2$	0,2652	0,6		412—430							840	420
n/60	$^5/_6$	0,0884	0,2		169,6	169						280	111
n/180	$^5/_{18}$	0,0294	0,2		69,7							93,3	23,6
n/540	$^5/_{54}$	0,0098	0,2		28,67							31,1	2,7
					Versuch 64	Versuch 65							
n/20	$^5/_2$	0,265	0,6		430?							840	420
n/40	$^5/_4$	0,1326	0,4		238—232							420	185
n/80	$^5/_8$	0,0663	0,2		132,6	133						210	78
n/160	$^5/_{16}$	0,0331	0,2			76,7						105	29
					Versuch 66	Versuch 67	Flascheninhalt						
n/30	$^5/_3$	0,1768	0,4		306—310?	100 ccm n/50 Na_2CO_3	100 ccm	200 ccm	300 ccm	500 ccm		560	254
							Schütteldauer $2^1/_4$ Std.		Harnsäure in mg				
n/90	$^5/_9$	0,0589	0,2		122	+ 0,2 g $\overline{U}$	178,7	178,7	184,1	200,3		186,6	64
n/270	$^5/_{27}$	0,0196	0,2		50,6							62,2	11,6
n/810	$^5/_{81}$	0,0065	0,2		20,7							20,74	0

zu betrachten. Gerade bei dieser Konzentration zeigen sich in verschiedenen, gleichmäßig ausgeführten Versuchen etwas verschiedene Werte für ein und dieselbe Konzentration, sogar bei zwei Proben (Versuch 57), die unter genau gleichen Verhältnissen und gleiche Zeit geschüttelt wurden, eine Verschiedenheit von 4 mg. In Versuch 54 fanden sich 180,4 mg bei gleicher Schütteldauer wie in Versuch 54, in dem sich für dieselbe Konzentration 194,4 mg $\bar{U}$ ergaben. Die gleiche Erscheinung zeigt sich bei den Werten höherer Konzentrationen (n/10, n/20); in der Tabelle sind diese Werte mit einem ? versehen, das bedeutet, daß in anderen Versuchen erheblichere Abweichungen von diesen Werten beobachtet wurden. Es ist möglich, daß ein Teil dieser Abweichungen auf kaum verhütbare Verluste an CO_2 beim Filtrieren zurückzuführen ist, die bei der nun höheren Alkalinität der Na_2CO_3-Lösungen größere Fehler verursachen können; aber im Zusammenhalt mit anderen Erscheinungen darf es als wahrscheinlicher gelten, daß der Gleichgewichtszustand zwischen gelöster und freier CO_2, der sich beim Schütteln allmählich ausbildet, in diesen Versuchen um so eher eine kleine Verschiebung erfährt, als die bei der Salzbildung aus dem Na_2CO_3 in Freiheit gesetzte CO_2 einen Teil des Na_2CO_3 in $NaHCO_3$ überführen muß und so schließlich eine offenbar leicht variable Mischung von $Na_2CO_3 + NaHCO_3$ resultiert, deren quantitative Zusammensetzung neben der vorhandenen, in ihren Komponenten variablen CO_2-Menge, den Umfang der Salzbildung bestimmt.

Jedenfalls bleibt auch bei Anwendung von Na_2CO_3 die Salzbildung hinter der theoretisch möglichen zurück, sie ist aber entsprechend dem geringen CO_2-Gehalt erheblich größer als beim Bicarbonat. Auch sind die Differenzen der Salzbildung bei verschiedenem Schüttelvolumen geringer. So zeigen die $\bar{U}$-Werte bei Zunahme des Luftvolumens von 50 auf 100 ccm gar keine Änderung und steigen bei weiterer Volumenvermehrung nur um einen geringen Betrag (wie besonders Versuchsnummer 67 beweist, in der alle Proben gleichzeitig geschüttelt wurden); bei dem geringen CO_2-Gehalt, der zum Teil noch durch Na_2CO_3 gebunden wird, verursachen eben kleine Zunahmen des Luftvolumens keine besondere Erniedrigung des Druckes.

Während beim Bicarbonat mit zunehmender Konzentration die Menge der unterdrückten $\bar{U}$ viel rascher ansteigt als die zur Salzbildung verwendete, nimmt beim Carbonat die Salzbildung im höheren Grade zu als die Menge der unterdrückten $\bar{U}$, ein Verhalten, das sich auch deutlich in der Kurve der $\bar{U}$-Werte ausprägt. Untersucht man das gegenseitige Verhältnis der bei n/50 $(1/2)^n$ erhaltenen $\bar{U}$-Werte, so findet man innerhalb des Konzentrationsbereichs von etwa n/500 bis n/30 Na_2CO_3 fast genau das Verhältnis 4 : 7; so ist in Versuch 55 194,6 . 4/7) = 111 (identisch mit dem gefundenen Wert), 194,6 . $(4/7)^2$

= 63,4 (gef. 63,1), 194,6 . $(4/7)^3$ = 36,2 (gef. 36,2). Dasselbe findet sich in Versuchen 54, 56 und 58. Für die Konzentration n/50 . $(1/3)^n$ ergibt sich innerhalb desselben Bereichs der Quotient der $\overline{U}$-Werte zu 0,4118 oder für die steigende Konzentration zu 2,428. So ist in Versuch 60 191,3 . 0,4118 = 78,7 (gef. 76,7), 191,3 . $(0,4118)^2$ = 32,4 (gef. 32,2), der für 1/27 Millimol Na_2CO_3 gefundene Wert 14,2 entspricht bereits einer vollständigen Salzbildung, da 2/27 Millimol $\overline{U}$ = 12,4 mg sind. In den Versuchen 62, 64 und 66 stimmt die Berechnung mit den gefundenen Werten ebenfalls sehr gut überein, mit Ausnahme der Werte für n/20 und n/30, die, wie früher erwähnt, in verschiedenen Versuchen Differenzen bis zu 20 mg ergaben. Da diese Werte bereits stark an der Grenze der Löslichkeit des $\overline{U}$-Natriums liegen, waren Versuche mit höheren Konzentrationen nicht mehr ausführbar. In Versuchsnummer 66 wird bei n/810 Na_2CO_3 wieder der theoretisch verlangte Wert erreicht. Ordnet man die gefundenen Werte wieder in eine Kurve, so zeigt dieselbe ein ähnliches Verhalten wie beim Bicarbonat, nur daß diese Exponentialkurve noch gestreckter und in größerer Annäherung an die Abszissenachse verläuft. Auch hier ist die Krümmung keine stetige, da infolge der vollständigen Salzbildung bei den niedrigsten Konzentrationen von Na_2CO_3 der Anfangsteil eine gerade Linie darstellt; sie erscheint aber außerdem bei hohen Konzentrationen etwa in der Gegend von n/30 einen Wendepunkt zu besitzen, wo ein Übergang in eine gerade Linie erfolgt, der sich einerseits wegen des Schwankens der Werte für diese Konzentrationen, andererseits wegen der beginnenden Unlöslichkeit des Natriumbiurats nicht mit Sicherheit feststellen läßt[1]).

---

[1]) Die allgemeine Gleichung dieser Kurve ist dieselbe wie jene für das Bicarbonat angegebene. Die Verschiedenheit beruht nur auf der Verschiedenheit des Quotienten, der größer ist als beim Bicarbonat, und dadurch verläuft die Kurve näher der Abszissenachse, d. h. mit zunehmender Konzentration an Carbonat wächst die *gebildete* $\overline{U}$ rascher an als die *unterdrückte*. Zur Berechnung des Quotienten der Harnsäurewerte für die $(1/3)^n$ (bzw. für die zunehmende Konzentration: 3^n) Konzentrationen kann auch hier — soweit sie im Geltungsbereich der Exponentialkurve liegen — die Gleichung $\operatorname{tg} \alpha = \frac{\log 2}{\log 7/4} = \frac{\log 3}{\log x}$ dienen; x ergibt sich daraus zu 2,428, für die abnehmenden Konzentrationen zu $\frac{1}{2,428}$ = 0,4118. Ebenso wie beim Bicarbonat ergeben die Logarithmen der Konzentrationen als Ordinaten und die Harnsäurewerte als Abszissen aufgetragen, eine *gerade* (*logarithmische*) *Linie*; ihre Gleichung ist nach Einsetzen der entsprechenden Werte in die S. 93 angegebene allgemeine Gleichung:

$$\log y = 1,2386 \log x - 0,80908.$$

Der Geltungsbereich dieser Gleichung ist jedoch kleiner als jener beim Bicarbonat angegebenen, da die Exponentialkurve bereits zwischen n/40 und n/30 Na_2CO_3 einen Wendepunkt hat (Übergang in eine gerade Linie).

Daß die Salzbildung auch bei Na_2CO_3 nicht so leicht erfolgt, obgleich die gebildete neutralisierte CO_2 entweichen kann, zeigen folgende Versuche, die in der beim Bicarbonat beschriebenen Weise (S. 19) angestellt wurden (Schütteln in offenen Gefäßen).

100 ccm Na_2CO_3	Zugesetzte Harnsäure g	Versuch 68	Versuch 69	Theoretischer Harnsäurewert	Schütteldauer
		Gefundene Harnsäure			
n/50	0,4	252	260	336	In allen Proben 1½ Stunden
n/100	0,4	135	144	168	
n/150	0,2		100	112	
n/200	0,2	80	79	84	
n/400	0,2	39,6	42	42	
n/450	0,2		38	37,3	

Nur bei den geringsten Konzentrationen von n/400 nach abwärts erfolgt unter den angegebenen Bedingungen eine vollständige Salzbildung, auch wenn die Neutralisations-CO_2 entweichen kann; bei etwas höheren Konzentrationen führt selbst 1½stündiges Schütteln bei offenen Gefäßen nicht zur vollständigen Salzbildung. Es müssen also die geringen in Lösung verbleibenden CO_2-Mengen noch hemmend einwirken. Entfernt man diese Reste von CO_2 durch ausgiebiges Luftdurchleiten, so erfolgt die Salzbildung zwar erheblich rascher als beim Bicarbonat, aber auch erst nach längerer Zeit. So wurde in einer

n/100 Carbonatlösung + 0,2 g Ū nach 4stündigem Luftdurchleiten 159 g Ū gebildet (statt 168), in einer

n/200	Carbonatlösung	nach	2stündigem	Luftdurchleiten	57,6 mg Ū
n/200	„	„	7 „	„	79,4 „ Ū
n/200	„	„	11 „	„	81,0 „ Ū (statt 84).

Das Gesamtergebnis dieser mit Carbonat angestellten Versuchsreihen ist also, daß auch hier eine vollständige Bildung von harnsaurem Salz nicht erzielt werden kann, falls nicht für völlige Entfernung der CO_2 gesorgt ist; der Umfang der Salzbildung ist jedoch gegenüber dem beim Bicarbonat erzielten, entsprechend dem geringen CO_2-Gehalt, ein wesentlich höherer.

III.

Gemeinsame Betrachtung der mit Bicarbonat und Carbonat erhaltenen Versuchsresultate erweisen also den ausgesprochenen hemmenden Einfluß der CO_2 auf die Löslichkeit der Harnsäure und die Bildung ihrer Salze in geschlossenen Systemen.

An dieser Hemmung sind drei Faktoren beteiligt, die in einem gegenseitigen Abhängigkeitsverhältnis stehen, Menge und Druck der

freien, sowie die Menge der absorbierten CO_2; bei dem komplizierten, während des Schüttelprozesses zur Ausbildung kommenden Gleichgewichte, in dem zunächst die Harnsäure CO_2 in Freiheit setzt, diese CO_2 zum Teil sich löst, zum Teil als Gas sich ansammelt, durch neu entstehende unter Druck gesetzt wird, durch das Schütteln teilweise wieder aus der Flüssigkeit entfernt wird, unter neuer Druckvermehrung der ausgeschüttelten und wieder neu hinzukommenden CO_2 sich wieder löst usw., ist es unmöglich, jeden dieser untereinander im Zusammenhang stehenden Faktoren zahlenmäßig festzulegen. Um jedoch eine annähernde Vorstellung von den Druckverhältnissen während des Neutralisationsvorganges zu gewinnen, wurde folgender Versuch ausgeführt.

Versuch 70.

Drei Proben zu je 100 ccm n/50 $NaHCO_3$ wurden mit 0,2 g $\overline{U}$ versetzt und die Flaschen von 500 ccm Rauminhalt gleichzeitig geschüttelt. Eine dieser Proben wurde unter sorgfältiger Abdichtung mit einem *Lux*schen Manometer verbunden, dessen Teilung die Ablesung in Millimeter Wasserdruck gestattet.

In dieser Probe wurde der Druck während des Schüttelns beobachtet, in der zweiten gleichzeitig geschüttelten Probe der $\overline{U}$-Gehalt zu einem Zeitpunkt bestimmt, an dem die „Druckprobe" den höchsten Druck aufwies, ferner in der dritten gleichzeitig geschüttelten Probe die $\overline{U}$ zu einem Zeitpunkt bestimmt, bei dem der Druck deutlich zu sinken begann, und schließlich wurde am Ende des Schüttelns der $\overline{U}$-Gehalt der „Druckprobe" selbst festgestellt. Im einzelnen verlief der Versuch folgendermaßen:

Zeit	Druck	Zeit	Druck
11h17′	0	11h32′	154
11 17½′	—10	11 34½′	158
11 18½	+ 40	11 37½	161
11 19½	60	11 40′	162
11 20½	75	11 42	163
11 22′	93	11 44	164 1. Bestimmung der $\overline{U}$
11 23½	104	11 48	166
11 24½	108	11 53	166
11 25½	111	12 10	161 2. Bestimmung der $\overline{U}$
11 27½	141 (Störung)	12 17	
		12 45	154
11 39½	148	1	90

Wie aus den Zahlen für den Druck ersichtlich, steigt derselbe in den ersten 3 Minuten sehr beträchtlich an, von Minute zu Minute um 20 bis 30 mm, nach etwa 7 Minuten nur etwa 3 mm, zuletzt nur alle 2 Minuten um 1 mm, und erreicht das Maximum nach 31 Minuten. (Die absolute Druckhöhe ist infolge Eindringens einiger Wassertropfen in den Verbindungsschlauch von 11 Uhr 27 Minuten ab um etwa 25 mm zu hoch.) Die $\overline{U}$-Bestimmung der Kontrollprobe um 11 Uhr 48 Minuten,

wo das Druckmaximum erreicht war, ergab 137,1 mg Ū. Dann hielt sich der Druck eine Zeitlang auf gleicher Höhe, etwa 20 Minuten lang, um dann langsam abzusinken. U-Gehalt der zweiten Kontrollprobe um 12 Uhr 17 Minuten = 137,1 mg. Um 1 Uhr wurde der Versuch abgebrochen. Die Ū-Bestimmung in der „Druckprobe“ um 1 Uhr ergab 139 mg Ū.

Zwei Proben von je 100 ccm n/50 Na_2CO_3 + 0,3 g Ū werden in Glasflaschen von 500 ccm Rauminhalt geschüttelt, die eine, wie im vorhergehenden Versuch, in Verbindung mit dem Manometer:

Zeit	Druck mm	Zeit	Druck mm
10h38'	— 19	Nach 11'	+ 40
nach 1'	— 12	„ 12	+ 43
„ 3	— 40	„ 13	+ 45,5
„ 5	+ 9	„ 25	+ 49
„ 6	+ 15	„ 20	+ 62
„ 7	+ 21	„ 35	+ 72
„ 8	+ 27	„ 40	+ 75
„ 9	+ 31,5	„ 45	+ 76,5
„ 10	+ 36,5	„ 55	+ 77
		Um 11h38 (60')	1. Ū-Bestimmung + 77
		„ 12 08	2. Ū-Bestimmung + 76

Hier steigt (nach anfänglich negativem Druck, der wohl durch Temperatureinflüsse verursacht war) der Druck viel langsamer an; in den ersten Minuten unter Überwindung des negativen Druckes rascher, aber schon nach 5 Minuten nur um 5 mm und dann jede weitere Minute bis etwa 10 Minuten um den gleichen Betrag, von da ab immer langsamer, bis nach einer Stunde der höchste Druck erreicht ist. Die zu diesem Zeitpunkte vorgenommene Ū-Bestimmung der Kontrollprobe ergab 202,1 mg Ū. Der Druck bleibt dann fast ½ Stunde konstant und die „Druckprobe“ enthält dann genau dieselbe Menge 202,1 mg Ū. Beide Versuche zeigen also übereinstimmend das relativ rasche Anwachsen der CO_2 als Zeichen der Salzbildung in den ersten Minuten, dann wächst der Druck nur langsam, offenbar weil unter der Wirkung der bereits gebildeten CO_2 die Salzbildung nur langsam vor sich geht. Mit der Erreichung des Druckmaximums ist die Salzbildung die maximale. Weiteres Schütteln ändert dann nichts mehr an diesen Werten (ebensowenig wie die dann erfolgende Senkung des Druckes). In Versuch 71 ist der Druck wesentlich geringer als beim Bicarbonat — ungefähr die Hälfte —, was ja dem um die Hälfte geringeren CO_2-Gehalt entsprechen würde[1]). Immerhin ist es auffallend, daß noch ein

[1]) Ein mit Li_2CO_3 in gleicher Weise ausgeführter Versuch führte zu den gleichen Druck- und Harnsäurewerten wie im Versuch 71.

Druck von dieser Höhe zustande kommt, weil doch ein Teil der entwickelten CO_2 vom Carbonat gebunden werden müßte. Aus diesem wird offenbar durch neu einwirkende $\overline{U}$ die CO_2 verdrängt, und so entsteht ein sehr komplizierter Kreisprozeß, der in seinen Einzelheiten nicht zu übersehen und dessen Gleichgewicht ein schwankendes ist. Kann die CO_2 entweichen, so hängt die dann viel geringere Hemmung der Salzbildung wahrscheinlich nur noch von der Menge der absorbierten CO_2 bzw. der ihr entsprechenden Zahl von $(H^{\cdot})$ ab; da aber selbst sehr kleine Mengen absorbierter CO_2 noch immer hemmend auf die Salzbildung wirken können, wie aus den Versuchen 43 bis 49 sowie 68 und 69 deutlich zu ersehen ist, so ist auch für diesen Fall die zunächst außerhalb unserer Fragestellung liegende Möglichkeit diskutierbar, daß unter den gegebenen Bedingungen die CO_2 mit einer höheren als ihrer scheinbaren Dissoziationskonstante einwirke. Jedenfalls kann es als auffallend bezeichnet werden, daß beim Einleiten von CO_2 in die Lösung eines harnsauren Salzes eine beträchtliche Zeit verstreicht (also eine größere Menge CO_2 nötig ist) ehe die Harnsäure ausfällt, während umgekehrt solche Mengen, die zur Fällung nicht ausreichen, die Bildung von harnsaurem Salz bereits verhindern können. Kurz zusammengefaßt, haben also unsere Untersuchungen[1]) zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. *Bestimmung von Harnsäure in CO_2-haltigen Flüssigkeiten, die neben gelöster auch ungelöste Harnsäure enthalten, ergeben nur unter Beachtung gewisser Vorsichtsmaßregeln verläßliche Resultate*; *Bestimmungen durch Rückwägen des ungelösten Anteils sind unter solchen Bedingungen fehlerhaft.*

2. *Die Löslichkeit der Harnsäure bzw. die Salzbildung in Lösungen von Bicarbonaten geht dem Gehalt an Bicarbonat nicht geradlinig parallel, sondern entspricht einer Exponentialfunktion, wenn die durch Neutralisation gebildete CO_2 nicht völlig entweichen kann* (*ausgenommen die niedrigsten Konzentrationen*). *Für Carbonat gilt die gleiche Gesetzmäßigkeit innerhalb eines kleineren Konzentrationsbereichs, nur mit veränderter Neigung und gestreckterem Verlauf der Kurve (höhere Harnsäurewerte). Niedrige Konzentrationen ergeben eine vollständige Salzbildung, höhere Konzentrationen* (ungefähr von n/30 angefangen) *eine geradlinige, aber nicht vollständige Proportionalität der Harnsäurebildung.*

3. *Kleine Mengen absorbierter CO_2 hemmen die Bildung der harnsauren Salze noch in merklichem Umfang.*

4. *Bei der Neutralisation entstehende oder unter Druck sich entwickelnde CO_2 übt einen so stark hemmenden Einfluß auf die Bildung*

[1]) Dieselben werden nach verschiedenen Richtungen fortgeführt.

harnsaurer Salze aus, als würde sie — wenigstens zu einem Teile — mit ihrer wahren Dissoziationskonstante zur Wirkung gelangen.

Erwägt man nun, inwieweit diese Ergebnisse die unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen sich vollziehende Salzbildung zu beleuchten imstande sind, so erscheinen zunächst die im Organismus für die Salzbildung gegebenen Bedingungen mit denen unserer Versuche recht wohl vergleichbar: der Gehalt des Blutes an Bicarbonat kann in seinen Schwankungen annähernd dem einer n/30 bis n/10 $NaHCO_3$-Lösung gleichgesetzt, der ebenfalls variable Gehalt an gelöster Kohlensäure mit einem Durchschnittswert von rund 4 mg-% angenommen werden, die unter einem Druck von etwa 30 mm Hg steht. Da nun das Gefäßsystem sowie die Gewebe im ganzen als ein „geschlossenes System" betrachtet werden dürfen, in dem zwar ein gewisses Gefälle an Kohlensäure besteht, deren Menge aber — trotz des Regulationsmechanismus der Atmung — nie unter eine gewisse Schwelle sinkt, so wären anscheinend schon unter physiologischen Verhältnissen alle Bedingungen erfüllt, welche für die unvollständige Umsetzung der Harnsäure mit den kohlensauren Salzen des Blutes maßgebend sind, ganz besonders aber unter Bedingungen, die zu einer, wenn auch nur zeitweisen Anhäufung von Kohlensäure — wie an Stellen langsamen Blutstroms, im mangelhaft vaskularisierten Gewebe und unter pathologischen Verhältnissen — führen können.

Inwiefern jedoch diese Bedingungen durch die Gegenwart der Eiweißkörper des Blutes und der Gewebe, deren Funktion als Ampholyten, ihr CO_2-Bindungsvermögen, durch die geänderten Temperaturverhältnisse (Gemische von $CO_2 + NaHCO_3$ haben bei 38° C eine mehr als dreimal so große Alkalität) usw. eine Abänderung erfahren, kann nur experimentell ermittelt werden.

Bei der Wichtigkeit der Frage, in welcher Form die Harnsäure im Blute gelöst ist, wird man also angesichts der mitgeteilten Versuchsresultate neuerliche Untersuchungen über den Umfang der im Organismus stattfindenden Überführung der Harnsäure in ihre Salze — und auch anderer patho-physiologisch wichtiger Säuren, deren Dissoziationskonstante von ähnlicher Größenordnung ist, wie die der Harnsäure — für wünschenswert halten.

Herrn Ing. *R. Zörkendörfer* sagen wir auch an dieser Stelle für seine freundliche Mithilfe besten Dank.

Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt.

IV. Mitteilung:

Die Spaltung der Hexosemonophosphorsäuren[1]**.**

Von

Otto Meyerhof und Karl Lohmann.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 25. März 1927.)

Mit 16 Abbildungen im Text.

Inhaltsübersicht.

---

[1]) Vorläufige Mitteilung, Naturw. 14, 1277, 1926.

Das Ergebnis der bisherigen Arbeiten dieser Serie[1]) kann dahin zusammengefaßt werden, daß die Polysaccharide und gärfähigen Hexosen durch das gelöste, milchsäurebildende Ferment des Muskels nur nach vorhergehender Veresterung mit Phosphorsäure gespalten werden, daß aber die sich gleichzeitig mit dem Zerfall der Kohlehydrate anhäufende Hexosediphosphorsäure nicht selbst das Intermediärprodukt darstellt, sondern die Stabilisierungsform eines Esters, der selbst im status nascens als Intermediärprodukt figuriert. Genau das gleiche Resultat ergab sich auch für die alkoholische Gärung im Hefeextrakt. Dies Ergebnis forderte zu dem Versuch auf, die Hexosemonophosphorsäuren, die bei der Bildung der natürlichen Hexosediphosphorsäure („*Harden-Young*schen Säure“) als Zwischenstufen in Betracht kommen, auf ihr Verhalten bei der Milchsäurebildung und alkoholischen Gärung zu untersuchen. Dazu kommt insbesondere, daß nach einer kürzlichen Angabe *Embdens*[2]) das „Lactacidogen“ scheinbar keine Hexosediphosphorsäure ist, wie es bisher von ihm angenommen war[3]), sondern eine Hexosemonophosphorsäure.

Für die Untersuchung am wichtigsten sind die natürlichen Hexosemonophosphorsäureester, vor allem der *Robison*sche[4]), der spontan bei der Gärung im Hefeextrakt gebildet wird, sowie der *Neuberg*sche[5]), der zwar selbst artifiziell durch Säurehydrolyse entsteht, aber aus der natürlichen *Harden-Young*schen Säure. Zum Vergleich wurden auch

[1]) *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **178**, 349, 462, 1926; **183**, 176, 1927.
[2]) *Embden* und *Zimmermann*, Ber. d. ges. Physiol. **88**, 157, 1926.
[3]) *Dieselben*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **141**, 254, 1924.
[4]) Biochem. Journ. **16**, 809, 1922.
[5]) Diese Zeitschr. **88**, 432, 1918.

verschiedene synthetisch hergestellte Hexosemonophosphorsäuren auf ihr Verhalten studiert: die aus Saccharosemonophosphorsäure [*Neuberg-Pollak*[1])] durch Säurehydrolyse bzw. Invertinwirkung erhaltene Glucosemonophosphorsäure[2]) („Hatano-Säure"), ferner die nach *Levene* und *Meyer*[3]) sowie *Nodzu*[4]) durch Behandlung des in trocknem Pyridin gelösten Zuckers mit $POCl_3$ dargestellten Fructose- und Glucosemonophosphorsäuren („*Nodzu*sche Säuren"). Schließlich wurde auch eine von dem letzteren Autor durch vorhergehende Acetonylierung strukturchemisch näher bestimmte Glucosemonophosphorsäure hergestellt und untersucht (Glucose-3 oder -4-monophosphorsäure), die nach seinen Angaben von Acetonhefe gut vergoren werden soll.

Ferner verdienen die präformierten Phosphorsäureester des Muskels, das *Embden*sche „Lactacidogen" sowie das kürzlich von *Eggleton* beschriebene „Phosphagen"[5]) — welche Konstitution ihnen auch immer zukommen mag —, eine eingehende Untersuchung auf ihr Verhalten im Muskelextrakt, die jedoch einer besonderen Mitteilung vorbehalten bleibt. Hinsichtlich des „Phosphagens" *Eggletons* ist jedoch aus methodischen Gründen schon hier eine Bemerkung zu machen. *Eggleton* gelang der Nachweis, daß der weitaus größte Teil des Phosphats im intakten Muskel sich als säureinstabiler Ester vorfindet, aber bei den üblichen Phosphorsäurebestimmungsmethoden nach *Embden*, *Briggs* u. a. als anorganisches Phosphat bestimmt wird, indem von diesen nur der relativ säurestabile Ester, das „Lactacidogen" als solcher festgestellt werden kann. Danach sind die Angaben über das Verhalten des Phosphats bei der Ermüdung, Erholung usw. des intakten Muskels einer weitgehenden Abänderung bedürftig. Da die von uns benutzte Methode von *Fiske* und *Subbarow*[6]) für die Messungen im Muskelextrakt nach der *Embden*schen Methode eingestellt wurde, so wird auch in dieser der säureinstabile Ester als anorganisches Phosphat bestimmt. Nachdem uns Herr *Eggleton* in freundlicher Weise schon früher von seinen Ergebnissen unterrichtet hatte, haben wir durch vergleichende Messungen nach *Fiske* und *Subbarow* sowie *Bell* und *Doisy*[7]) und *Mathison*[8]) unter Berücksichtigung der Angaben *Eggletons* in vielen Fällen

---

[1]) Diese Zeitschr. **23**, 515, 1910; Berl. Ber. **43**, 2060, 1910.

[2]) *Neuberg* und *Sabetay*, diese Zeitschr. **162**, 479, 1925; *Neuberg* und *Hatano*, ebendaselbst **159**, 175, 1925.

[3]) Journ. of Biol. Chem. **48**, 223; **53**, 431; **54**, 805, 1921/1922.

[4]) Journ. of Biochemistry (Tokio) **6**, 31, 1925.

[5]) *P. Eggleton* und *M. G. Eggleton*, Nature **119**, 194, 1927; Biochem. Journ. **21**, 190, 1927.

[6]) Journ. of Biol. Chem. **66**, 375, 1925; *K. Lohmann* und *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. **178**, 419, 1926.

[7]) Journ. of Biol. Chem. **44**, 55, 1920.

[8]) *G. C. Mathison*, Biochem. Journ. **4**, 233, 1909.

festgestellt, ein wie großer Teil des „anorganischen Phosphats“ im Muskelextrakt in Wirklichkeit „Phosphagen“ ist, und wie sich dieses bei der Milchsäurebildung verhält. Danach ergab sich, daß schon bei der Herstellung des Extrakts ein Teil des „Phosphagens“ des Muskels zerfällt, ein größerer Teil noch in der Vorperiode der manometrischen Messungen — und zwar ohne Bildung von Milchsäure —, und daß in der üblichen Ausführung der Versuche, besonders wenn durch Zugabe von Phosphat der Gehalt der Enzymlösung daran verdoppelt oder verdreifacht wird, das „Phosphagen“ zu Versuchsbeginn in der Regel nur noch einige Prozent des Gesamtphosphats ausmacht, manchmal aber bis zu 25%. Es ließ sich kein Punkt feststellen, in dem die bisherigen Angaben über die Veresterung und Abspaltung des Phosphats bei der Milchsäurebildung im Muskelextrakt in einer bestimmten Richtung korrigiert werden müßten. Genau genommen ist aber unter den bisherigen und auch in der vorliegenden Arbeit verwandten Bezeichnungen „Veresterung“ und „Esterspaltung“ die Bildung und Aufspaltung des säurestabilen Esters zu verstehen. Trotz dieser Sachlage glauben wir nicht, daß das „Phosphagen“ für die Milchsäurebildung im Muskelextrakt bedeutungslos wäre. Für seine Mitwirkung hierbei spricht, daß das bei Versuchsbeginn noch vorhandene „Phosphagen“ in Gegenwart von Stärke, Glykogen und Zucker in gut glykolysierenden Extrakten zunächst keine Abnahme mehr erfährt, während es ohne Kohlehydratzusatz rasch zerfällt unter gleichzeitigem Verlust der glykolytischen Fähigkeit des Extrakts.

Im ersten Teil der Arbeit wird die Herstellung der benutzten Hexosemonophosphorsäuren behandelt, sowie ihre reduzierenden Eigenschaften, die mit ihrem Verhalten im Muskelextrakt in naher Beziehung stehen. Weiterhin dienen zu ihrer Charakterisierung die Dissoziationskonstanten sowie ihre Oxydierbarkeit in konzentrierter Phosphatlösung.

Im zweiten Teil werden die Milchsäurebildung und der Phosphatumsatz im Muskelextrakt und im dritten Teil die Vergärbarkeit der Monoester im Hefemazerationssaft behandelt.

I. Das chemische und physikalisch-chemische Verhalten der Hexosemonophosphorsäuren.

A. Herstellung und Analyse der Monoester.

1. Neubergsche Säure.

Im allgemeinen wurde nach der *Neuberg*schen Vorschrift[1]) gearbeitet. Als Ausgangsmaterial diente hexosediphosphorsaures Calcium [Candiolin von Bayers Farbwerken[2])]. Je etwa 15 g Candiolin wurden mit 150 ccm

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 88, 432, 1918.

[2]) Wir sind der Firma für die Lieferung einer großen Menge Candiolin zu Dank verpflichtet.

n HCl eine Stunde im Wasserbad bei 85° erwärmt, wobei etwa die Hälfte der Gesamtphosphorsäure abgespalten wurde. Die weitere Reinigung erfolgte durch oft wiederholte Umfällung des Bariumsalzes aus 50% Alkohol, die Trocknung der Hauptmenge des Präparats während einer Stunde im Hochvakuum mit der *Volmer*schen Quecksilberpumpe bei 78° über P_2O_5, die Bestimmung des Wassergehalts durch längere Trocknung bei gleicher Temperatur. Von dem in Wasser leicht löslichen Bariumsalz wurden mehrere Präparate hergestellt durch verschieden häufige Umfällung in Alkohol; doch zeigten diese keine wesentlichen Unterschiede. Analysen außer der Elementaranalyse auf wasserfreies Salz bezogen.

Ba-Bestimmung:

0,1082 g Substanz gaben 63,9 mg $BaSO_4$.

Ber.: 34,74%.
Gef.: 34,8%.

Gesamt-P-Bestimmung (nach *Embden*):

10,09 mg Substanz gaben 69,9 mg Niederschlag.

Ber.: 7,85%.
Gef.: 7,76%.

Anorganischer P (kolorimetr.):

mit 97 mg Ba-Salz gefunden 0,03 mg P_2O_5.
Anorganischer P = etwa 0,2% des Gesamt-P.

CH-Bestimmung (ausgeführt von der Feinchemie G. m. b. H., Tübingen):

5,190 mg Substanz gaben 3,330 mg CO_2, 1,53 mg H_2O,
$C_6H_{11}O_5PO_4Ba$, 1 H_2O.

Ber.: C 17,42%, H 3,17%.
Gef.: C 17,50%, H 3,30%.

Spezifische Drehung des Ba-Salzes:

$$l = 100\,\text{mm},\quad c = 3{,}03,\quad \alpha = +\,0{,}026^\circ,\quad [\alpha]_D^{21} = +\,0{,}82^\circ.$$

Spezifische Drehung der freien Säure (*c* berechnet aus dem P-Gehalt):

$$l = 100\,\text{mm},\quad \alpha = +\,0{,}066^\circ,\quad [\alpha]_D^{21} = +\,2{,}5^\circ.$$

Die freie Säure wurde durch Zusatz genau berechneter Schwefelsäure hergestellt, die Abwesenheit von Barium- und Schwefelsäureüberschuß kontrolliert. Für die Versuche mit Muskel- und Hefeextrakt diente das Natriumsalz, das durch Umsatz des gelösten Bariumsalzes mit Natriumsulfat gewonnen wurde.

2. Robisonsche Säure[1]).

400 ccm Mazerationssaft nach *Lebedew* aus Berliner Unterhefe der Hochschulbrauerei wurden mit 80 ccm 50% Saccharoselösung versetzt und portionsweise bei 28° 360 ccm m/2 Na_2HPO_4 hinzugegeben. Die Vergärung wurde an herausgenommenen Proben manometrisch verfolgt, die Veresterung

[1]) Biochem. Journ. **16**, 809, 1922.

des anorganischen Phosphats durch kolorimetrische P-Bestimmungen. Nach Veresterung von 17 g H_3PO_4 wurde der Versuch durch Zusatz von 25 g festem Ba-Acetat unterbrochen. Die weitere Aufarbeitung und Reinigung erfolgte nach der von *Robison* gegebenen Vorschrift. Von den beiden Präparaten I und II war das letztere durch weitere zweimalige Reinigung über das Bleisalz und fünfmalige Umfällung über das Ba-Salz aus Alkohol aus dem Präparat I erhalten. Beide unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Da das hexosemonophosphorsaure Ba bei längerem Erwärmen leicht zersetzt wird, wurde die Hauptmenge des Salzes nur eine Stunde bei 78° im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet. Die Trocknung bis zur Gewichtskonstanz nahm unter diesen Verhältnissen 6 Stunden in Anspruch.

Das Ba-Salz löst sich leicht mit exothermer Reaktion in Wasser.

Analysen des Präparats II.

Die Analysen sind stets, mit Ausnahme der CH-Bestimmungen, auf wasserfreie Substanz berechnet.

Ba-Bestimmung:

98,9 mg Substanz gaben 58,3 mg $BaSO_4$.

Ber.: Ba = 34,74 %.
Gef.: Ba = 34,69 %.

P-Bestimmung nach *Embden* (nach *Neumann* verascht):

10,30 mg Substanz gaben 73,0 mg Niederschlag.

Ber.: P = 7,85 %.
Gef.: P = 7,94 %.

Bestimmung des anorganischen P im Ba-Salz:

100 mg Ba-Salz gaben nach *Fiske* und *Subbarow* nur eine ganz schwache Färbung = etwa 0,2 % des Gesamt-P.

CH-Bestimmung (ausgeführt von der Feinchemie, G. m. b. H., Tübingen)

5,469 mg Substanz gaben 3,525 mg CO_2, 1,88 mg H_2O,

$C_6H_{11}O_5PO_4Ba$, 1 H_2O.

Ber.: C 17,42 %, H 3,17 %.
Gef.: C 17,58 %, H 3,85 %.

$[\alpha]_D$ des Ba-Salzes:

l = 200 mm,
c = 1,375 %,
α = + 0,440°,
$[\alpha]_D^{21}$ = + 15,98° ($[\alpha]_D^{20}$ des Präparats I [c = 0,281 %] = + 16,6°).

$[\alpha]_D$ der Säure:

l = 200 mm,
c = 0,815 % (berechnet aus dem P-Gehalt),
α = + 0,536°,
$[\alpha]_D^{20}$ = + 32,9° ($[\alpha]_D^{22}$ des Präparats I [c = 2,485 %] = + 33,9°).

Zum Vergleich diente ein Originalpräparat von *Robison*. Die freie Säure sowie das Natriumsalz wurden wie im Falle der *Neuberg*schen Säure aus dem Bariumsalz hergestellt.

3. Saccharosemonophosphorsäure (nach *Neuberg-Pollak*).

Die Darstellung folgte der Vorschrift der Autoren. Der Bariumgehalt erwies sich gegenüber dem theoretischen als zu gering. Als Erklärung

hierfür ergab die Elektrotitration der freien Säure (s. unten, S. 132), daß die Saccharosemonophosphorsäure ein Gemisch von primärem und sekundärem Phosphorsäureester war.

Analysen.

Ba-Bestimmung:

0,2430 g wasserfreiem Salz entsprachen 94,2 mg $BaSO_4$.

Ber.: 26,5 %.
Gef.: 22,83 %.

P-Bestimmung:

38,55 mg Substanz gaben 7,17 mg H_3PO_4.

Ber.: 5,75 %.
Gef.: 5,88 %.

Spezifische Drehung des Ba-Salzes:

$c = 1,93$,
$l = 100$ mm,
$a = +0,89^{0}$,
$[a]_D^{20} = +46,1^{0}$.

Spezifische Drehung der freien Säure:

$c = 2,42$ % (berechnet aus dem P-Gehalt),
$l = 100$ mm,
$a = +2,06^{0}$,
$[a]_D^{20} = +85,1^{0}$.

4. Durch Invertinspaltung gewonnene Glucosemonophosphorsäure aus Saccharomonophosphorsäure (*Sabetay* und *Hatano*).

Calciumsaccharomonophosphat wurde mit gereinigtem Invertin gespalten, das hierzu dienende Invertin nach *Willstätter* und *Schneider*[1]) durch Fällung von frischem Hefeautolysat mit 50 % Alkohollösung in der zehnfachen Menge Wasser, Adsorption an Kaolin in 1,5 n Essigsäure, sowie anschließender Elution mit 0,4 % Natriumphosphat, Reinigung mittels Dialyse in Kollodiumschläuchen hergestellt. In Übereinstimmung mit *Neuberg* und *Sabetay* sowie *Kuhn* und *Münch*[2]) wurden nur etwa 30 % des Saccharophosphats gespalten. Nach zweimaliger Reinigung über das Bleisalz durch Fällung mit wenig Pb-Subacetat und fünfmaligem Umfällen des Bariumsalzes aus 50 % Alkohol enthielt die Verbindung noch 12 % Saccharophosphat.

5. Hexosemonophosphorsäure durch Säurespaltung der Saccharomonophosphorsäure [nach *Sabetay* u. *Rosenfeld*[3]) u. *Hatano*].

Eine bessere Reinigung der aus der Saccharomonophosphorsäure gewonnenen Glucosemonophosphorsäure gelang durch Säurehydrolyse.

6 g Ca-Saccharophosphat in 150 ccm Wasser gelöst, wurden mit 150 ccm n/2 Oxalsäure versetzt, der Niederschlag von Calciumoxalat abzentrifugiert

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **133**, 193, 1924.
[2]) Ebendaselbst **150**, 220, 1925.
[3]) Diese Zeitschr. **162**, 469, 1925.

und die Lösung 90 Minuten bei 80 bis 85° im Wasserbad hydrolysiert. Die weitere Reinigung erfolgte über das Pb- und das Ba-Salz, das wiederholt aus 50 % Alkohol umgefällt wurde.

Analysen.

Ba-Bestimmung:

Ber.: 34,74 %.
Gef.: 34,60 %.

Gesamt-P-Bestimmung:

Ber.: 7,85 %.
Gef.: 7,79 %.

Anorganischer P in Spuren.

Spezifische Drehung des Ba-Salzes:

$c = 1,00,$
$l = 200$ mm,
$\alpha = + 0,17°,$
$[\alpha]_D^{20} = + 8,5°.$

Spezifische Drehung der freien Säure:

$c = 0,585,$
$l = 200$ mm,
$\alpha = + 0,15°,$
$[\alpha]_D^{20} = + 12,8°.$

6. Synthetische Glucose- und Fructosemonophosphorsäure [nach *Nodzu*[1])].

Je 16 g bei 78° im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknete Glucose bzw. Fructose wurden in trockenem Pyridin gelöst, die Lösung auf — 20 bis — 25° abgekühlt und 12 g $POCl_3$ in 30 ccm Pyridin in kleinen Portionen unter beständigem Rühren hinzugegeben. Das Pyridin war zunächst über KOH, dann durch fünfstündiges Kochen am Rückflußkühler über BaO getrocknet. Nach Zugabe des gesamten $POCl_3$, wobei die Temperatur — 15° nicht überstieg, wurde das Gemisch noch 3 Stunden auf etwa — 10° gehalten und dann über Nacht bei Zimmertemperatur. Am nächsten Tage wurde wieder auf — 20° abgekühlt, unter starker Kühlung feuchtes Pyridin und schließlich 200 ccm Eiswasser hinzugegeben. Die besonders stark im Falle der Fructose gebräunte Lösung wurde mit $Ba(OH)_2$ bis zur Lackmusalkalität versetzt, CO_2 durchgeleitet und die Lösung nach dem Filtrieren in 60 % Alkohol gefällt. Die Ba-Salze wurden zunächst über das Pb-Salz durch Fällung mit Pb-Subacetat, schließlich durch wiederholte Umfällung des Ba-Salzes in 60 % Alkohol gereinigt.

Die Präparate gaben von der theoretischen Zusammensetzung abweichende Analysen. Ein geringerer Ba- und ein höherer P-Gehalt lassen darauf schließen, daß auch hier wie bei der direkten Phosphorylierung der Saccharose der Phosphorsäurerest zum Teil mit zwei Hydroxylgruppen der Hexose verestert ist. Mit Fructose wurden unter denselben Bedingungen zwei Präparate dargestellt, die jedoch auch untereinander beträchtliche Differenzen aufwiesen.

---

[1]) *Nodzu*, Journ. of Biochem. **6**, 31, 1925; vgl. *Levene* und *Meyer*, Journ. of Biol. Chem. **48**, 233, **53**, 431; **54**, 805.

6a. Glucose-3- (oder 4-)monophosphorsäureester (nach *Nodzu*).

Von den verschiedenen strukturchemisch definierten Estern des japanischen Autors wählten wir diesen, weil er nach seinen Angaben am leichtesten vergärbar ist.

Die wahrscheinliche Konstitution dieses Esters ergibt sich aus seiner Darstellung durch Phosphorylierung von Diacetonglucose. Nach *Ohle*[1]) besitzt die Diacetonglucose die Konstitution einer 1, 2, 5, 6-Diacetonglucose mit einem 1, 4- oder 1, 3-Oxydring. Wie weit allerdings bei der Abspaltung der beiden Acetonreste in saurer Lösung Umlagerungen entstehen, kann nicht entschieden werden.

Die Diacetonglucose wurde nach *E. Fischer* und *Rund*[2]) auf Grund der Untersuchungen von *Ohle*[3]) durch Schütteln von Glucose (*Kahlbaum*) in der zwanzigfachen Menge Aceton, die mit 1% H_2SO_4 angesäuert war, erhalten. Das abgeschiedene, mit Acetonmonoglucose verunreinigte Präparat wurde durch Fällen mit konzentrierter Natronlauge, Aufnehmen des Niederschlags in Essigester, Eindampfen und zweimaliges Umkristallisieren gereinigt. F. 109°. Die Phosphorylierung erfolgte in der von *Levene* und *Meyer*[3]) sowie *Nodzu* angegebenen Weise. Nach dem Abdampfen des Pyridins im Vakuum, Fällen des Cl mit Ag_2SO_4 wurde die Lösung ohne vorhergehende Isolierung des Ba-Salzes der Diacetonhexosemonophosphorsäure sofort nach *Nodzu* in 0,4 n H_2SO_4 in 24 Stunden bei 40° zur Hexosemonophosphorsäure hydrolysiert. Das Ba-Salz besitzt in besonderem Maße (ähnlich wie das der *Robison*schen Säure) die Fähigkeit, in konzentrierterer Lösung $BaCO_3$ in Lösung zu halten. Es ist daher nötig, die Reinigung und Umfällung (in 50% Alkohol) aus etwa 1% wässeriger Lösung vorzunehmen.

Das Ba-Salz färbt sich beim mehrstündigen Trocknen bei 78° im Vakuum über P_2O_5 gelbbraun. Für die Untersuchung wurde daher ein nicht völlig getrocknetes Präparat verwendet, das auf seinen Trockengehalt umgerechnet wurde.

Spezifische Drehungen.

α) Fructosephosphat, Präparat I:

$[\alpha]_D^{18}$ des Ba-Salzes $= -21{,}0°$ ($c = 0{,}973$, $a = -0{,}205°$, $l = 100$ mm).
$[\alpha]_D^{19}$ der freien Säure $= -28{,}9°$ ($c = 0{,}693$, $a = -0{,}200°$, $l = 100$ mm).

Präparat II:

$[\alpha]_D^{18}$ des Ba-Salzes $= -15{,}1°$ ($c = 0{,}981$, $a = -0{,}148°$, $l = 100$ mm).
$[\alpha]_D^{18}$ des Ba-Salzes nach *Nodzu* $= -17{,}6°$.

β) Glucosephosphat:

$[\alpha]_D^{18}$ des Ba-Salzes $= +26{,}0°$ ($c = 0{,}984$, $a = +0{,}256°$, $l = 100$ mm).
$[\alpha]_D^{19}$ der freien Säure $= +33{,}8°$ ($c = 0{,}71$, $a = +0{,}240°$, $l = 100$ mm).

γ) Glucose-3-(4-)monophosphorsäureester:

1. Wasserbestimmung:
37,74 mg Substanz verloren 1,55 mg Wasser = 4,1%, entsprechend 1 Mol H_2O.

---

[1]) B. 57, 403, 1566, 1924.
[2]) Ebendaselbst 49, 88, 1916.
[3]) l. c.

2. Ba-Bestimmung:

   101,1 mg trockene Substanz gaben 59,8 mg $BaSO_4$ = 34,80 %, ber.: 34.74%.

3. P-Bestimmung (nach *Embden*):

   10,11 mg Substanz gaben 68,3 mg Niederschlag = 7,56 % P, ber.: 7,85 %.

4. $[\alpha]_D$ des Ba-Salzes:

   $c = 1{,}01\,\%$,
   $l = 100$ mm,
   $\alpha = +\,0{,}25^0$,
   $[\alpha]_D^{18} = +\,24{,}7^0$.

5. $[\alpha]_D$ der freien Säure:

   $c = 2{,}56\,\%$ (berechnet aus dem P-Gehalt),
   $l = 100$ mm,
   $\alpha = +\,1{,}06^0$,
   $[\alpha]_D^{18} = +\,41{,}4^0$.

B. Reduktionswerte.

Zur Charakterisierung der verschiedenen Ester sehr geeignet erwies sich die Bestimmung des Reduktionswertes einerseits nach *Bertrand*, andererseits nach *Willstätter* und *Schudel*, sowie, wenigstens qualitativ, der Ausfall der *Seliwanoff*schen Ketosereaktion. Die Bertrandreduktion ist für Glucose und Fructose nahezu gleich, bei substituierten Zuckern sinkt dagegen der Reduktionswert in verschieden starkem Maße. Andererseits ist die Reduktion nach *Willstätter* und *Schudel* charakteristisch für Aldosen und wird, wie es scheint, durch Substitution außerhalb der Carbonylgruppe in ihrer Stärke nicht beeinflußt[1]). Fructose zeigt bei Einhaltung der *Willstätter*schen Vorschrift nur einen minimalen Jodverbrauch ($^1/_{40}$ wie Glucose), der vergleichsweise vernachlässigt werden konnte. Der Ausfall dieser Reaktionen erlaubte Rückschlüsse auf das physiologische Verhalten der betreffenden Monoester. Wir geben für jeden einzelnen im folgenden die erhaltenen Resultate wieder und in Tabelle I eine Zusammenstellung derselben. Die Reduktion wurde teils mit dem Bariumsalz, teils mit der freien Säure ausgeführt.

1. Neubergsche Säure.

Reduktionswert nach *Bertrand*: 1,0 ccm einer 0,10045 mol. Säure mit 18,1 mg Hexose entsprachen 26,9 mg Cu = 13,3 mg Glucose bzw. Fructose. Verhältnis Hexose : Reduktionswert = 1,36.

Nach *Willstätter* und *Schudel*: 2,0 ccm der 0,10045 mol. Säure = 36,2 mg Hexose wurden mit 5,0 ccm n/10 Jod in alkalischer Lösung umgesetzt; Verbrauch 0,73 ccm n/10 Thiosulfat = 6,63 mg Aldose. Verhältnis Hexose : Aldose = 5,46.

---

[1]) Vgl. *Sobotka*, Journ. of Biol. Chem. **69**, 267, 1926.

*Seliwanoff*sche Reaktion: Starke Rotfärbung. Etwa 10 mg Ba-Salz wurden in 1 ccm Wasser gelöst, mit 1 ccm 25 % Salzsäure (*Kahlbaum*) und etwas Resorcin versetzt und genau 20 Sekunden gekocht. Eine entsprechende Glucoselösung blieb farblos.

2. Robisonsche Säure.

Reduktionswert nach *Bertrand*: Präparat I: 1,0 ccm einer 0,09554 mol. Säure (bezogen auf P) mit 17,2 mg Hexose (ber.) entsprachen 27,7 mg Cu = 13,7 mg Glucose. Verhältnis Hexose : Reduktionswert = 1,25.

Reduktionswert nach *Willstätter* und *Schudel*:

a) Präparat I: 2,0 ccm der 0,09554 mol. Säure mit 34,4 mg Hexose wurden mit 5,0 ccm n/10 Jodlösung in alkalischer Lösung behandelt. Verbraucht 2,51 ccm n/10 Thiosulfat = 22,8 mg Aldose. Verhältnis Hexose : Aldose = 1,51.

b) Präparat II: Hexosemonophosphorsäure mit 5,63 mg Hexose (bezogen auf P) wurden mit n/100 Jodlösung behandelt. Verbraucht 4,17 ccm n/100 Thiosulfat = 3,79 mg Aldose. Verhältnis Hexose : Aldose = 1,48.

c) Untersucht ein von Herrn Dr. *Robison* erhaltenes Präparat[1]): 7,47 mg Ba-Salz (+ 1 H_2O) mit 3,24 mg Hexose. Verbraucht 2,05 ccm n/100 Thiosulfat = 1,86 mg Aldose. Verhältnis Hexose : Aldose = 1,74.

*Seliwanoff*sche Reaktion: Schwache Rosafärbung.

3. Hexosemonophosphorsäure (nach *Neuberg* und *Hatano*).

(Nur durch Säurehydrolyse gewonnen.)

Reduktionswert nach *Bertrand*: 32,5 mg Ba-Salz mit 14,75 mg Hexose entsprachen 11,9 mg Cu = 5,7 mg Glucose. Verhältnis Hexose : Reduktionswert = 2,59.

Reduktionswert nach *Willstätter* und *Schudel*: 9,95 mg Ba-Salz mit 4,53 mg Hexose entsprachen 2,60 ccm n/100 Thiosulfat = 2,34 mg Aldose. Verhältnis Hexose : Aldose = 1,95.

Reduktionswert eines von Herrn Prof. *C. Neuberg* gelieferten „Hexosemonophosphors. Ca aus Rohrzuckerphosphorsäure". 10,12 mg Ca-Salz (+ 2 H_2O) mit 5,46 mg Hexose entsprachen 2,97 ccm n/100 Thiosulfat = 2,68 mg Aldose. Verhältnis Hexose : Aldose = 2,04.

*Seliwanoff*sche Reaktion: Beide Präparate gaben ziemlich starke Rotfärbung.

4. Nodzusche Säuren.

Reduktionswerte nach *Bertrand*:

α) Fructosephosphorsäureester. Präparat I. Einem Gehalt des Ba-Salzes von 18,8 mg Hexose entsprachen 14,16 mg Cu = 6,8 mg Glucose. Verhältnis Hexose : Reduktionswert = 2,77. Präparat II. Hexose ber. 24,0 mg. Reduktionswert gef. 18,6 mg Cu = 9,05 mg Glucose. Verhältnis Hexose : Reduktionswert = 2,65.

β) Glucosephosphorsäureester. Einem Gehalt von 20.4 mg Hexose entsprachen 13,8 mg Cu = 6,65 mg Glucose. Verhältnis Hexose : Reduktionswert = 3,07.

---

[1]) Vgl. diese Zeitschr. 178, 471, 1926.



Reduktionswert nach *Willstätter* und *Schudel*:

α) Fructosephosphorsäureester. Präparat I. Hexose ber. 4,7 mg, Aldose gef. 1,09 mg. Verhältnis Hexose : Aldose = 4,3. Präparat II. Hexose ber. 4,80 mg, Aldose gef. 1,30 mg. Verhältnis Hexose : Aldose = 3,69.

β) Glucosephosphorsäureester. Hexose ber. 5,08 mg, Aldose gef. 2,56 mg. Verhältnis Hexose : Aldose = 1,99.

γ) Hexose-3-(oder 4-)monophosphorsäure:

Reduktionswert nach *Bertrand* (*Möckel-Frank*): Hexosegehalt ber. 17,45 mg, Hexosegehalt gef. 4,24 ccm n/20 $KMnO_4$ = 6,5 mg Glucose. Verhältnis Hexose : Reduktionswert = 2,69.

Reduktionswert nach *Willstätter* und *Schudel*: Hexosegehalt ber. 8,8 mg, Aldosegehalt gef. 5,66 mg. Verhältnis Hexose : Reduktionswert = 1.55.

Nach *Seliwanoff*: Sehr schwache gelbrote Färbung.

Eine Übersicht über die Resultate ist in der Tabelle I enthalten.

Tabelle I.

Reduktionswerte der Hexosemonophosphorsäuren im Vergleich zu denen von Glucose und Fructose.

Verbindung	Verhältnis Hexose / Reduktionswert nach *Bertrand*	Verhältnis Hexose / Aldose nach *Willstätter* und *Schudel*	Verhältnis *Willstätter*-Reduktion / *Bertrand*-Reduktion	*Seliwanoff*sche Reaktion
Glucose	1,0	1,0	1,0	—
Fructose	1,0	40	0,025	++++
Hexosediphosphorsäure (*Harden-Young*)	2,37	23,5	0,10	+++
*Robison*sche Säure	1,25	1,50	0,83	+
*Neuberg*sche Säure	1,36	5,46	0,25	+++
*Hatano*sche Säure	2,59	1,95	1,33	++
Dieselbe, von Prof. *C. Neuberg* geliefertes Präparat		2,04		++
*Nodzu*sche Säuren:				
α) Fructosephosphorsäureester, Präparat I	2,77	4,3	0,65	++ } mit gelblichem Ton
„ II	2,65	3,69	0,72	++ } mit gelblichem Ton
β) Glucosephosphorsäureester	3,07	1,99	1,54	+ Dasselbe
γ) Glucose-3-(4-)phosphorsäureester	2,69	1,55	1,73	(+) „

Aus der Übersicht läßt sich das Folgende entnehmen: Die Reduktion nach *Bertrand* ist bei den natürlichen Estern annähernd so groß wie bei den freien Hexosen, bei den übrigen aber weniger als halb so groß und noch geringer als bei der Hexosediphosphorsäure. Andererseits zeigt das Verhalten der *Willstätter*schen Jodtitration, daß die Hexose-

diphosphorsäure offenbar keinen Zucker mit freier Aldehydgruppe enthält, während dies bei allen anderen der Fall ist. Immerhin bestehen beträchtliche Unterschiede; am wenigsten Aldose enthält die *Neuberg*sche Säure, am meisten die *Robison*sche. Diesem Verhalten entspricht das Ausfallen der *Seliwanoff*schen Reaktion, die etwa reziprok dem nach *Willstätter* bestimmten Aldosengehalt ist.

C. Oxydation in Phosphatlösung.

Ein weiteres Charakteristikum der Monoester stellt ihre spontane Oxydation in neutraler Phosphat- und Arseniatlösung vor. Wie *Warburg* und *Yabusoe*[1]) zeigten, wird Fructose im Gegensatz zu Glucose bei Körpertemperatur in konzentrierter Phosphatlösung durch Luftsauerstoff rasch unter Kohlensäurebildung oxydiert. Nach *O. Meyerhof* und *Matsuoka*[2]) sowie *Wind*[3]) handelt es sich hierbei um eine Metallkatalyse. Die verschiedenen Phosphorsäureester zeigen unter gleichen Umständen ein ganz verschiedenes Verhalten, worüber die Tabelle II Auskunft gibt. Setzt man die Oxydationsgeschwindigkeit der Fructose = 100, so wird unter gleichen Umständen (Temperatur 37°, molares Phosphat, p_H etwa 8; 0,04 mol. Hexose) Hexosediphosphorsäure überhaupt nicht, dagegen der *Neuberg*sche Ester gut doppelt so rasch oxydiert wie Fructose. Da die *Harden-Young*sche Säure offenbar Fructose enthält, die aber auch bei der Bertrandreduktion nur schwach anspricht, ergibt sich, daß für die Oxydationsfähigkeit der Fructosegruppe in Phosphatlösung ein hoher Bertrandreduktionswert erforderlich ist. Weiterhin wird auch die *Robison*sche Säure in Phosphat oxydiert, aber nur etwa ein Viertel so stark wie die *Neuberg*sche. Nimmt man an, daß die *Robison*sche und die *Neuberg*sche Säure beide isomere Gemische derselben Fructose- und Glucosemonophosphorsäure in verschiedenem Verhältnis sind, so läßt sich aus der Tabelle I berechnen, daß die *Neuberg*sche Säure etwa 75, die *Robison*sche etwa 17% Fructosereste enthält. Diesem Verhältnis entspricht fast genau das Verhältnis der Oxydationsgeschwindigkeiten in Phosphatlösung.

Im Gegensatz zu den natürlichen Monoestern werden die synthetischen nur ganz geringfügig angegriffen, gleichgültig, ob sie aus Glucose oder Fructose hergestellt sind. Auch dies stimmt mit ihrer geringen Bertrandreduktion überein.

Daß die stärkere Oxydierbarkeit der *Neuberg*schen Säure gegenüber reiner Fructose tatsächlich auf einer erhöhten Reaktionsfähigkeit beruht und nicht etwa auf einem verschiedenen Metallgehalt der

---

[1]) Diese Zeitschr. **146**, 380, 1924.
[2]) Ebendaselbst **150**, 1, 1924.
[3]) Ebendaselbst **159**, 58, 1925.

Tabelle II. Oxydation der Monoester in Phosphat- und Arseniatlösung. (37°).

Nr.	Datum 1926 u. 1927	Versuchszeit Min.	Flüssigkeitsvolumen	Molare Konzentration Arseniat (A) Phosphat (P)	Benutzte Zucker	Molare Konzentration des Zuckers	cmm O_2	Oxydationsgeschwindigkeit in % der Fructoseoxydation
1	15. XI.	90	2,0	1,0 P	Fructose	0,033	37,1	100
					Glucose	0,033	5,3	14
					Robison-Säure	0,033	16,9	46
					Neuberg-Säure	0,033	80,6	220
2	15. XI.	90	2,0	1,0 A	Fructose	0,033	64,0	100
					Neuberg-Säure	0,033	170	260
3	27. XI.	90	2,0	1,0 A	Fructose	0,037	98,5	100
					Glucose	0,037	0	0
					Robison-Säure	0,037	70	71
					Neuberg-Säure	0,037	230	235
					Hexosediphosphorsäure	0,037	1	0
4	15. I.	90	1,9	1,1 P	Fructose	0,048	98	100
					Neuberg-Säure	0,048	209	210
					*Hatano*sche Säure (Säure gesp.)	0,048	17,5	18
					Saccharomonophosphorsäure	0,048	0	0
5	15. I.	90	2,0	1,0 A	Fructose	0,045	97	100
					*Hatano*sche Säure (Säure gesp.)	0,045	26	27
6	4. II.	60	1,9	1,1 P	Fructose	0,048	92	100
					*Hatano*sche Säure (Ferment gespalten)	0,048	0	0
					Nodzu-Glucoseester	0,048	15,5	17
					Nodzu-Fructoseester	0,048	18	20
7	8. III.	60	2,0	1,0 P + 10^{-4} Cu	Fructose	0,040	113	100
				1,0 P	*Neuberg*-Säure	0,040	118	
				1,0 P + 10^{-4} Cu	„ „	0,040	230	200
8	12. III.	90	2,0	1,1 P	Fructose	0,040	40	100
					Nodzu Glucose-3-(4-)phosphors.	0,040	0	0

Präparate, ergibt sich durch Zusatz von m/10000 Kupfersulfat. Durch diesen Zusatz wird die Oxydationsgeschwindigkeit der *Neuberg*schen Säure ähnlich gesteigert wie die der Fructose (Tabelle II, Versuch 7). Ebenso ergibt sich ein ähnlicher respiratorischer Quotient. Wie das folgende Kapitel zeigt, entspricht das Verhalten der natürlichen und synthetischen Monoester im Muskel- und Hefeextrakt sehr nahe demjenigen gegenüber der Phosphatlösung. *Besonders wichtig erscheint, daß die Hexosediphosphorsäure in beiden Fällen stabiler als freie Fructose ist, die „natürliche" Hexosemonophosphorsäure dagegen aktiver.*

Nebenher wurde auch die Oxydation in ganz schwach alkalischem NH_3-NH_4Cl-Gemisch untersucht, da nach *Krebs*[1]) hierin auch Glucose, allerdings erheblich schwächer als Fructose, oxydiert wird. Der stärkste Umsatz findet danach in Gegenwart von 2 Mol. $CaCl_2$ und etwa 2 Millimol $Cu^{\cdot\cdot}$ statt (p_H 8,4). Die Reihenfolge der Oxydation der Ester stimmte, wie der folgende Versuch zeigt, fast genau mit der in konzentrierter Phosphatlösung überein.

Versuch. 17. März 1927.

2 ccm 1,5 n NH_3-Gemisch (4 Teile NH_4Cl + 1 Teil NH_3) mit 1,6 Mol. $CaCl_2$ und 0,2 Millimol. $CuSO_4$, 0,04 Mol. Zucker, geben in 60 Minuten:

	cmm Sauerstoff	% von Fructose-oxydation
Fructose	395	100
Glucose	22	5,5
Neuberg-Ester	600	150
Robison-Ester	243	61
Hatano-Ester (Säurespaltung)	67	17
Nodzu-3-(4-)glucosemonoester	2	0

D. Die Dissoziationskonstanten der Monoester.

Ebenso wie kürzlich die Dissoziationskonstanten der Hexosediphosphorsäure und Glycerinphosphorsäure[2]) wurden diejenigen der verschiedenen Monoester durch Elektrotitration bestimmt. Dies war sowohl aus theoretischen wie praktischen Gründen von Interesse; aus theoretischen: Da die mittleren ersten und zweiten Dissoziationskonstanten der Hexosediphosphorsäure mit der der Glycerinphosphorsäure fast quantitativ übereinstimmten, ergab sich die Frage, ob zwischen der Größe derselben und der Zahl der auf einen Phosphorsäurerest entfallenden OH-Gruppen ein fester Zusammenhang besteht. Wenn dies der Fall sein sollte, war zu erwarten, daß die Dissoziationskonstanten

[1]) Diese Zeitschr. 180, 377, 1927.
[2]) *O. Meyerhof* und *J. Suranyi*, diese Zeitschr. 178, 427, 1926.

in der Reihe Hexosemonophosphorsäure—Saccharomonophosphorsäure weiter ansteigen müßten.

Aus praktischen Gründen war aber die Kenntnis der pK'_2-Werte nötig, um die bei der Abspaltung des anorganischen Phosphats bzw. der Umlagerung der Monophosphorsäuren zum Di-Ester eintretende p_H-Verschiebung bestimmen und danach die „Veresterungskorrektur" der manometrischen Ablesungen berechnen zu können.

1. Hexosediphosphorsäure.

Da die Hexosemonophosphorsäuren zweibasische Säuren sind, so entsprechen die ersten und zweiten Dissoziationskonstanten ohne weiteres denen der Phosphorsäure. Dagegen stellt die Hexosediphosphorsäure theoretisch eine vierbasische Säure vor; jedoch wurden die zusammengehörigen beiden ersten Konstanten (d. h. die K_1-Werte der beiden Phosphorsäurereste a und b) und ebenso die beiden zweiten nicht getrennt[1]); es wurden vielmehr die nach der monomolekularen Reaktionsformel berechneten Konstanten als die mittlere erste und die mittlere zweite bezeichnet, um sie mit den entsprechenden der Phosphorsäure vergleichen zu können[2]). Tatsächlich gestattet jedoch die Titrationskurve, worauf uns Herr Dr. *H. H. Weber* hinwies, die vier Dissoziationskonstanten der Hexosediphosphorsäure getrennt zu berechnen, wenn man nämlich die Berechnung der benachbarten Konstanten auf die bimolekulare Reaktionsformel gründet. Dieses Verfahren ist dem von *van Slyke* und *Hastings*[3]) überlegen, da es auch für beliebig benachbarte Konstanten brauchbar ist.

Ist nämlich N die Gesamtnormalität während der Titration, n der jeweils undissoziierte Anteil derselben (bei schwachen Säuren also gleich der normalen Konzentration der Säure minus g-Äquivalent zugesetzter Base), so ist $n/N = \bar{\varrho}$ („Normalitätsrest"). Für einbasische Säuren gilt

$$\bar{\varrho} = \frac{h}{K + h}, \qquad (1)$$

für zweibasische Säuren

$$\bar{\varrho} = \frac{h + \frac{K_1}{2}}{h + K_1 + \frac{K_1 \cdot K_2}{h}}. \qquad (2)$$

---

[1]) *O. Meyerhof* und *J. Suranyi*, diese Zeitschr. **178**, 427, 1926.

[2]) Die in der Arbeit von *O. Meyerhof* und *J. Suranyi* angegebenen Molaritäten beziehen sich ebenfalls auf die Phosphorsäurereste; m/10 bedeutet daher m/10 Phosphorsäurerest in m/20 Hexosediphosphorsäure. Dies ist versehentlich in der Arbeit nicht hervorgehoben, geht aber aus den Titrationskurven ohne weiteres hervor.

[3]) Journ. of Biol. Chem. **52**, 525, 1922; **53**, 269, 1922.

Diese letztere Formel unterscheidet sich von der „Dissoziationsrest"-formel durch das zweite Glied des Zählers, das dadurch entsteht, daß bei der Titration der nur primär dissoziierte Anteil zu dem total undissoziierten hinzugezählt wird, bis er durch die weitere Titration aufgespalten wird. Es kann also dann auch bei beliebig kleinen K_2-Werten die Formel der zweibasischen Säure niemals in die der einbasischen übergehen, weil stets doppelt so viel Lauge zur vollständigen Titration der Valenzen verbraucht werden muß. Benutzt man nun zwei Punkte der Titrationskurve mit den zusammengehörigen Wertepaaren ϱ', h' und ϱ'', h'', so ergibt sich aus (2):

$$K_1 = \frac{h'^2\left(\frac{1}{\varrho'} - 1\right) - h''^2\left(\frac{1}{\varrho''} - 1\right)}{h' - h'' - \frac{h'}{2\,\varrho'} + \frac{h''}{2\,\varrho''}}, \tag{3}$$

$$K_2 = \frac{\frac{h'^2}{K_1} + \frac{h'}{2}}{\varrho'} - \frac{h'^2}{K_1} - h', \tag{4}$$

wobei $K_1 > K_2$.

Die ϱ-Werte ergeben sich unmittelbar aus den Ordinaten, während die Abszissen Logarithmus h enthalten. Die Konstanz von K_1 und K_2 läßt sich durch Einsatz weiterer Wertepaare der Titrationskurve ϱ''', h''' usw. prüfen. Für eine scharfe Bestimmung der getrennten Dissoziationskonstanten nach dieser Formel ist die Titrationskurve aus der angeführten Arbeit nicht genau genug. Doch läßt sich aus mehreren Punkten derselben im Gebiet der K'_2-Dissoziation an Stelle des mittleren pK'_2-Wertes von 6,29 ungefähr für die theoretisch dritte und vierte Konstante berechnen:

$$pK'_{2a} = pK'_3 = 6{,}1,$$
$$pK'_{2b} = pK'_4 = 6{,}5.$$

2. Neubergscher Ester.

Die Titrationskurve der *Neuberg*schen Säure ist auf Abb. 1 wiedergegeben, wo gleichzeitig die Kurven der *Hatano*schen Säure und die der Phosphorsäure (letztere aus der Arbeit von *O. Meyerhof* und *J. Suranyi*) eingezeichnet sind. Einige Punkte dieser Kurven sind in der Tabelle III zur Berechnung der Dissoziationskonstanten benutzt:

Elektrotitration: Säure = 0,10045 mol.,
Lauge = 0,10045 n,
$T = 21^{\circ}$.

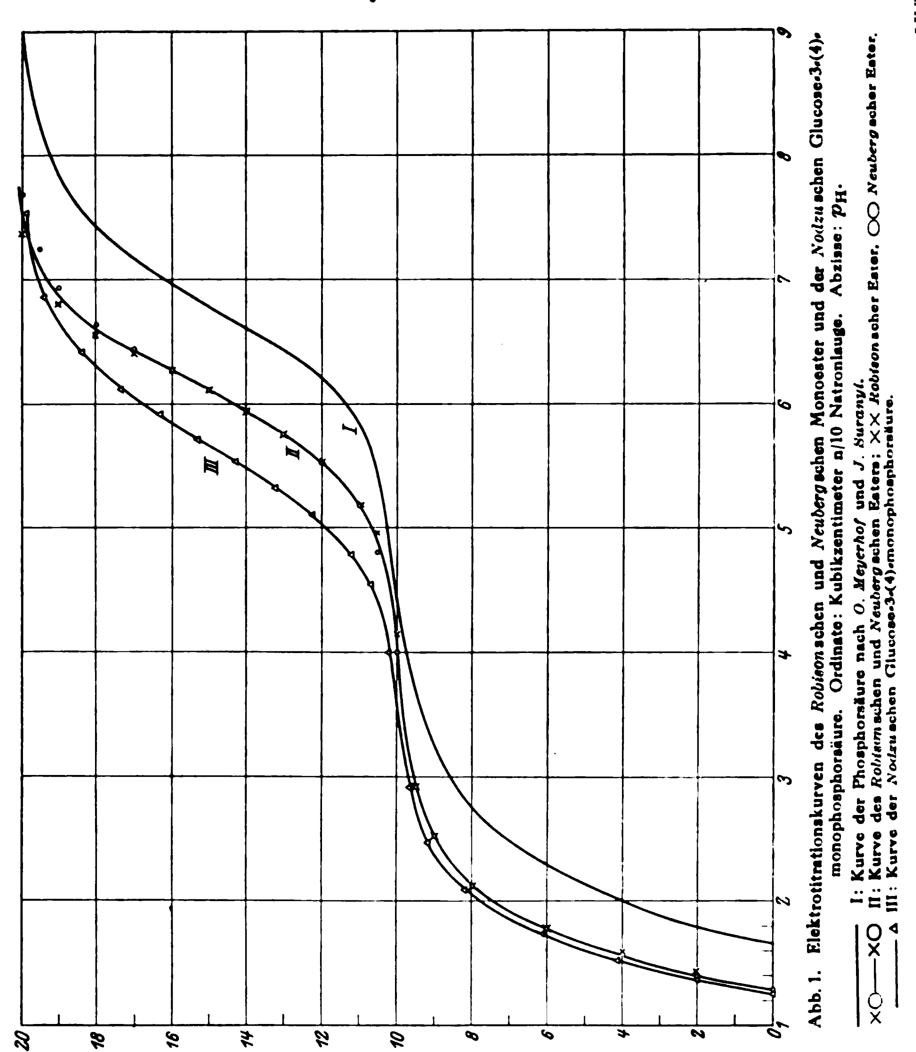


Abb. 1. Elektrotitrationskurven des *Robison*schen und *Neuberg*schen Monoester und der *Nodzu*schen Glucose-3-(4)-monophosphorsäure. Ordinate: Kubikzentimeter n/10 Natronlauge. Abzisse: p_H.

——— I: Kurve der Phosphorsäure nach *O. Meyerhof* und *J. Suranyi*.
×○——×○ II: Kurve des *Robison*schen und *Neuberg*schen Esters; ×× *Robison*scher Ester, ○○ *Neuberg*scher Ester.
———△ III: Kurve der *Nodzu*schen Glucose-3-(4)-monophosphorsäure.

Tabelle III. Berechnung der ersten Dissoziationskonstante[1]).

$$K_1' = \frac{[H^{\cdot}] \times [B + H^{\cdot}]}{C - [B + H^{\cdot}]}.$$

Lauge, ccm	C	B	H˙	K'	pK'
2,00	$8{,}34 \times 10^{-2}$	$1{,}67 \times 10^{-2}$	$4{,}27 \times 10^{-2}$	$1{,}05 \times 10^{-2}$	0,97
4,00	$7{,}14 \times 10^{-2}$	$2{,}86 \times 10^{-2}$	$2{,}76 \times 10^{-2}$	$1{,}02 \times 10^{-2}$	0,99
6,00	$6{,}25 \times 10^{-2}$	$3{,}75 \times 10^{-2}$	$1{,}70 \times 10^{-2}$	$1{,}15 \times 10^{-2}$	0,94
8,00	$5{,}56 \times 10^{-2}$	$4{,}44 \times 10^{-2}$	$0{,}75 \times 10^{-2}$	$1{,}05 \times 10^{-2}$	0,97
				Mittel:	0,97

[1]) Bezeichnungen nach *van Slyke*, Journ. of Biol. Chem. **52**, **525**, 1922

Tabelle IV. Berechnung der zweiten Dissoziationskonstante pK'_2.

$$pK' = p_H - \lg \frac{B}{C - B}; \; c = 0{,}050.$$

Lauge ccm	B	p_H	pK'
11,0	$0{,}5 \times 10^{-2}$	5,18	6,13
12,0	$1{,}0 \times 10^{-2}$	5,52	6,12
13,0	$1{,}5 \times 10^{-2}$	5,75	6,12
14,0	$2{,}0 \times 10^{-2}$	5,94	6,12
15,0	$2{,}5 \times 10^{-2}$	6,11	6,11
16,0	$3{,}0 \times 10^{-2}$	6,26	6,07
17,0	$3{,}5 \times 10^{-2}$	6,44	6,07
		Mittel:	6,11

Es ergibt sich $pK'_1 = 0{,}97$, $pK'_2 = 6{,}11$.

3. Robisonscher Ester.

Genau dasselbe Resultat ergibt die Elektrotitration der *Robison*schen Säure, deren Werte gleichzeitig mit denen der *Neuberg*schen Säure in der Kurve *A* aufgenommen sind, und, wie man sieht, mit dieser so gut wie vollständig zusammenfallen. Einige Punkte sind im folgenden zur Berechnung benutzt; daraus ergibt sich $pK'_1 = 0{,}94$, $pK'_2 = 6{,}11$.

Säure (bezogen auf P) = 0,09554 mol.,
NaOH (CO_2-frei) = 0,09554 n,
$T = 21^0$.

Tabelle V. Berechnung der ersten Dissoziationskonstante pK'_1.

$$K' = \frac{H^{\cdot} \times [B + H^{\cdot}]}{C - [B + H^{\cdot}]}.$$

Lauge ccm	C	B	H^+	K'	pK'
4,00	$7{,}00 \times 10^{-2}$	$2{,}79 \times 10^{-2}$	$2{,}82 \times 10^{-2}$	$1{,}13 \times 10^{-2}$	0,95
6,00	$6{,}12 \times 10^{-2}$	$3{,}68 \times 10^{-2}$	$1{,}67 \times 10^{-2}$	$1{,}16 \times 10^{-2}$	0,94
8,00	$5{,}44 \times 10^{-2}$	$4{,}35 \times 10^{-2}$	$0{,}764 \times 10^{-2}$	$1{,}18 \times 10^{-2}$	0,93
				Mittel:	0,94

Berechnung der zweiten Dissoziationskonstante pK'_2.

$$pK' = p_H - \lg \frac{B}{C - B}; \; c = 0{,}048.$$

Lauge ccm	B	p_H	pK'
12,00	$0{,}96 \times 10^{-2}$	5,53	6,13
13,00	$1{,}44 \times 10^{-2}$	5,75	6,12
14,00	$1{,}82 \times 10^{-2}$	5,92	6,10
15,00	$2{,}30 \times 10^{-2}$	6,12	6,12
16,00	$2{,}78 \times 10^{-2}$	6,28	6,09
		Mittel:	6,11

Es wurde ferner der Einfluß von Salzzusätzen auf die scheinbare zweite Dissoziationskonstante bestimmt. Der Einfluß war geringer als bei der Hexosediphosphorsäure. Die Resultate sind in der Tabelle VI enthalten.

Neubergsche Säure.

2,0 ccm einer Lösung von 1 Teil Hexosephosphorsäure ($c = 0{,}10045$ mol.) + 1,5 Teilen NaOH ($c = 0{,}10045$ n) wurden mit je 0,44 ccm m/2 Salzlösung bzw. Wasser verdünnt. Die Bestimmung der $[H]$ erfolgte in der Birnenelektrode nach *Michaelis*. $T = 21^{\circ}$.

Robisonsche Säure.

2,0 ccm von einem Teile einer 0,09554 mol. Hexosemonophosphorsäurelösung mit 1,5 Teilen NaOH ($c = 0{,}09554$ n) wurden mit je 0,44 ccm m/2 Salzlösung bzw. mit derselben Menge Wasser verdünnt.

Tabelle VI.

Zusatz	*Neuberg*sche Säure		*Robison*sche Säure	
	p_H	Δp_H	p_H	Δp_H
1. Destilliertes Wasser . . .	6,10	—	6,12	—
2. KCl	5,95	— 0,15	5,98	— 0,14
3. NaF	5,97	— 0,13	5,99	— 0,13
4. Oxalat	5,99	— 0,11		
5. Tartrat	5,96	— 0,14		

4. Saccharosemonophosphorsäure und Hatanosche Säure.

Bei der Elektrotitration der Saccharosemonophosphorsäure ergab sich die schon oben erwähnte Anomalie: Während die primäre Dissoziation normal verlief, war zur Absättigung des sekundären H-Ions der Phosphorsäure erheblich weniger NaOH erforderlich als berechnet. Infolgedessen war die Dissoziationskonstante hier nicht berechenbar. Die Kurve im Vergleich mit der der Phosphorsäure ist in Abb. 2 wiedergegeben.

Die Anomalie der Dissoziationskonstante verschwand bei der Säurehydrolyse. Auch die so erhaltene Glucosemonophosphorsäure (*Hatano*) wurde der Elektrotitration unterworfen. Auch diese Kurve ist in Abb. 2 dargestellt. Beide Dissoziationskonstanten sind größer als die der natürlichen Monoester, und zwar ergibt sich nach der Tabelle VII pK'_1 zu 0,61, pK'_2 zu 5,83.

Hexosemonophosphorsäure nach *Neuberg* und *Hatano*.

Elektrotitration: c der Hexosemonophosphorsäure (bezogen auf P) $= 0{,}09935$ mol., c der NaOH $= 0{,}09935$ n, $T = 20^{\circ}$.

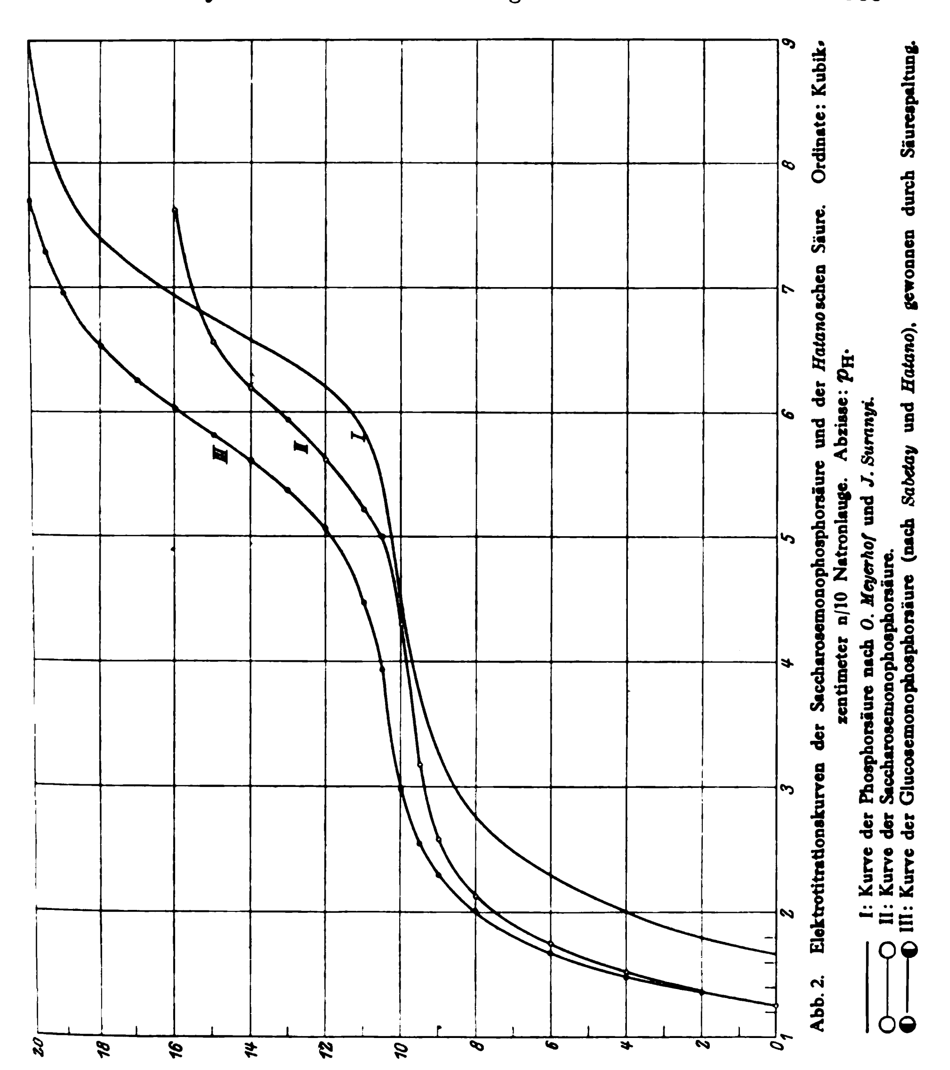


Abb. 2. Elektrotitrationskurven der Saccharosemonophosphorsäure und der *Hatano*schen Säure. Ordinate: Kubikzentimeter n/10 Natronlauge. Abszisse: p_H.

I: Kurve der Phosphorsäure nach *O. Meyerhof* und *J. Suranyi*.

II: Kurve der Saccharosemonophosphorsäure.

III: Kurve der Glucosemonophosphorsäure (nach *Sabetay* und *Hatano*), gewonnen durch Säurespaltung.

Tabelle VII.

Berechnung der ersten Dissoziationskonstante.

Lauge auf 10,0 ccm Säure	C	B	$H^{\cdot}$	K'	pK'_1
4,0	$7{,}10 \times 10^{-2}$	$2{,}84 \times 10^{-2}$	$3{,}39 \times 10^{-2}$	$2{,}43 \times 10^{-2}$	0,62
6,0	$6{,}20 \times 10^{-2}$	$3{,}73 \times 10^{-2}$	$2{,}05 \times 10^{-2}$	$2{,}56 \times 10^{-2}$	0,60
				Mittel:	0,61

Berechnung der zweiten Dissoziationskonstante.

$c = 0{,}050.$

Lauge auf 10,0 ccm Säure	B	p_H	pK'_2
13,0	$1{,}5 \times 10^{-2}$	5,38	5,78
14,0	$2{,}0 \times 10^{-2}$	5,61	5,79
15,0	$2{,}5 \times 10^{-2}$	5,83	5,83
16,0	$3{,}0 \times 10^{-2}$	6,04	5,86
17,0	$3{,}5 \times 10^{-2}$	6,28	5,91
		Mittel:	5,83

5. Glucose-3-(4-)monophosphorsäure (nach *Nodzu*). (Abb. 1.)

c der NaOH = 0,0970 n,
c der Säure = 0,0970 mol.,
$T = 21^{0}$.

Berechnung der ersten Dissoziationskonstante.

Lauge ccm	C	B	$H^{\cdot}$	K'	pK'_1
4,0	$6{,}92 \times 10^{-2}$	$2{,}69 \times 10^{-2}$	$3{,}02 \times 10^{-2}$	$1{,}43 \times 10^{-1}$	0,84
6,0	$6{,}06 \times 10^{-2}$	$3{,}52 \times 10^{-2}$	$1{,}82 \times 10^{-2}$	$1{,}35 \times 10^{-1}$	0,87
8,0	$5{,}38 \times 10^{-2}$	$4{,}23 \times 10^{-2}$	$0{,}871 \times 10^{-2}$	$1{,}58 \times 10^{-1}$	0,80
				Mittel:	0,84

Berechnung der zweiten Dissoziationskonstante.

Lauge ccm	p_H	B	$p_{K'_2}$
11,00	4,70	0,004 85	5,66
12,00	5,07	0,009 70	5,71
13,00	5,29	0,014 55	5,66
14,00	5,49	0,019 40	5,67
15,00	5,66	0,024 25	5,66
16,00	5,85	0,029 10	5,67
17,00	6,04	0,033 95	5,67
18,00	6,30	0,038 80	5,70
		Mittel:	5,67

Zusammenfassend ergibt also die elektrometrische Titration, daß die beiden natürlichen Monoester ein pK'_1 von 0,94 bzw. 0,97 haben und ein pK'_2 von 6,11; dagegen die beiden synthetischen Ester von *Hatano* und *Nodzu* ein pK'_1 von 0,61 bzw. 0,84, ein pK'_2 von 5,83 bzw. 5,67. Die Hexosemonophosphorsäuren sind danach erheblich stärkere Säuren als die Hexosediphosphorsäure; außerdem sind die beiden untersuchten synthetischen Säuren stärker als die natürlichen; ob dies ein durchgängiger Unterschied, ähnlich wie die Geschwindigkeit der Oxydation in Phosphat und die Größe der Reduktionswerte ist, muß dahingestellt bleiben.

II. Die Spaltung der Hexosemonophosphorsäuren im Muskelextrakt.

A. Allgemeiner Verlauf des Umsatzes.

Die folgenden Versuche beschränken sich fast völlig auf den Umsatz des *Neuberg*schen und *Robison*schen Esters, weil alle synthetischen Monophosphate sich hinsichtlich der charakteristischen Zerfallsreaktion ganz oder nahezu unwirksam erwiesen.

Fügt man eine gewisse Menge *Neuberg*sche oder *Robison*sche Säure zum Muskelextrakt hinzu, so setzt eine sehr rasche, aber bald zum Stillstand kommende Milchsäurebildung ein. Dabei tritt aber nicht eine gleichzeitige Abspaltung von Phosphat auf; im Gegenteil, das Phosphat der Lösung nimmt mehr oder weniger ab. Mit dem Zerfall der Hexosemonophosphorsäure ist ein Übergang eines mehr oder minder großen Teils in Hexosediphosphorsäure verbunden. Im weiteren Verlauf der Reaktion, während die Geschwindigkeit der Milchsäurebildung stark sinkt, nimmt das Phosphat allmählich wieder zu. Direkte und indirekte Versuche führen zu dem Schluß, daß ein großer Teil des jetzt auftretenden Phosphats aus dem Zerfall der primär gebildeten Hexosediphosphorsäure stammt. Wodurch kommt der rasche Zerfallsvorgang zum Stillstand? In der Mehrzahl der Versuche durch nichts anderes als den nahezu völligen Schwund des Monoesters, teils durch Zerfall in Milchsäure, teils durch Umlagerung in Hexosediphosphorsäure. Ist dagegen der Phosphatgehalt der Lösung im Verhältnis zum zugesetzten Monoester klein, so führt ein anderer Umstand zum Stillstand des Prozesses: Es verschwindet dann das anorganische Phosphat während des Umsatzes bis auf die letzten Spuren, und dies führt zu einem Stillstand der Reaktion, obwohl durch die weitere Spaltung des Monoesters neues Phosphat nachgeliefert werden könnte. Es ergibt sich hier in Übereinstimmung mit der Spaltung der Hexosen[1]), daß ein gewisser Gehalt der Lösung an anorganischem Phosphat für den raschen Umsatz der Kohlehydrate unentbehrlich ist, auch wo es nicht unmittelbar in die Reaktion eintritt. Es läßt sich daher der Umsatz in der raschen Zerfallsperiode steigern sowohl dadurch, daß man den Gehalt der Lösung an anorganischem Phosphat vermehrt, als auch eventuell dadurch, daß man die zugesetzte Menge Monoester verringert, so daß bei ihrer Umlagerung nicht das anorganische Phosphat erschöpft wird (s. Abb. 4 u. 6). Neben den angeführten Ursachen kommt jedoch in anderen Fällen die Umlagerung auch aus unbekannten Gründen vorzeitig zum Stillstand, wahrscheinlich infolge einer weniger guten Beschaffenheit des Extrakts. Da die *Robison*sche Säure dann noch eher versagt als die *Neuberg*sche, liegt der Gedanke nahe, daß die Fructosegruppe leichter reagieren kann als die Glucosegruppe, ähnlich wie es auch für die freien Zucker

[1]) Diese Zeitschr. **188**, 185, 1927.



gilt. Jedoch beruht die geschilderte Zerfallveresterungsreaktion nicht auf einer vorherigen Abspaltung von stabiler Hexose; zu deren Umsatz bedurfte es ja des Zusatzes von Hefeaktivator, während der rasche Umsatz der Monoester sich ohne diesen vollzieht.

B. Methodik.

Die Methodik der Versuche stimmt im allgemeinen mit der der bisherigen Arbeiten dieser Serie überein. Jedoch ist die Berechnung der Veresterungskorrektur bei den manometrischen Messungen schwieriger als in den bisher behandelten Fällen, weil bei dem Umsatz die pK'_2-Werte von drei Körpern, dem anorganischen Phosphat, dem Mono- und Di-Ester, sowie ihre Pufferkapazitäten in dem betreffenden Milieu berücksichtigt werden müssen. Es ist diejenige Verschieburg der Wasserstoffzahl zu finden, die bei gleichbleibender Menge Alkalikation durch eine Änderung in der Verteilung der Phosphorsäurereste eintritt. Aus dieser Verschiebung kann dann das Milchsäureäquivalent derselben berechnet werden. Zur genauen Lösung dieser Aufgabe wären zahlreiche Messungen des p_H in Gemischen der Phosphate in An- und Abwesenheit verschiedener Salze auf mehreren Neutralisationsstufen erforderlich. Auf Grund der vorliegenden Daten läßt sich nur eine angenäherte Rechnung durchführen, wenn man annimmt, daß keine anderen Puffersubstanzen als die genannten drei Körper zugegen sind und daß sich das p_H als Mittel aus der relativen Konzentration jeder Komponente, multipliziert mit ihrer Pufferkapazität an der betreffenden Stelle der Titrationskurve, ergibt. Nennen wir die Konzentrationen des Monoesters, des Di-Esters und des anorganischen Phosphats C_M, C_D und C_A, die Pufferkapazitäten bei dem in Frage kommenden p_H (7,4) entsprechend β_M, β_D und β_A und bezeichnen die Anfangswerte mit dem Index I, die Endwerte mit dem Index II, so berechnet sich eine Verschiebung (Δ) des p_H

$$\Delta p_H = \frac{C_{M\,I}\cdot\beta_{M\,I}\cdot pK'_{2\,M} + C_{D\,I}\cdot\beta_{D\,I}\cdot pK'_{2\,D} + C_{A\,I}\cdot\beta_{A\,I}\cdot pK'_{2\,A}}{C_{M\,I}\cdot\beta_{M\,I} + C_{D\,I}\cdot\beta_{D\,I} + C_{A\,I}\cdot\beta_{A\,I}} - \frac{C_{M\,II}\cdot\beta_{M\,II}\cdot pK'_{2\,M} + C_{D\,II}\cdot\beta_{D\,II}\cdot pK'_{2\,D} + C_{A\,II}\cdot\beta_{A\,II}\cdot pK'_{2\,A}}{C_{M\,II}\cdot\beta_{M\,II} + C_{D\,II}\cdot\beta_{D\,II} + C_{A\,II}\cdot\beta_{A\,II}}.$$

Die Pufferkapazität β wird hierbei nach *van Slyke* gleich dem Differentialquotienten der Titrationskurve $\frac{d\ \text{Basenäquivalent}}{d\,p_H}$ angenommen, indem die maximale Pufferkapazität für $p_H = pK'$ gleich 1 gesetzt wird. Dann ergibt sich bei $p_H = 7{,}4$ β_A zu 0,68, β_D zu 0,33 und β_M zu 0,14. Ist Δp_H gefunden, so berechnet sich das Milchsäureäquivalent in Milligrammen, indem für $\beta = 1$ und einer Phosphatkonzentration, die dem (mittleren) Nenner der obigen Brüche gleich gesetzt wird, die zur Verschiebung des p_H erforderliche Säuremenge aus der Phosphatstandardkurve entnommen wird. Für 10 ccm mol. Phosphat und $\Delta p_H = 0{,}1$ ist das Äquivalent 0,575 ccm n Milchsäure = 52 mg[1]). Wird das Phosphat in Milligrammen P_2O_5 berechnet, so ist für $\Delta p_H = 0{,}1$ das Milchsäureäquivalent in Milligrammen = 0,075 × mg P_2O_5.

Die Änderung in der Verteilung der Phosphorsäurereste läßt sich direkt aus der Bestimmung der Milchsäure und des anorganischen Phosphats

[1]) Nach *van Slyke* gilt allgemein $\beta_{max} = 0{,}575\,C$, wo C die Äquivalentkonzentration des Puffers ist.

...pringer
in Berlin W 9



Linkstr. 23/24

Zu erscheinen beginnt:

April

Handbuch der Mikroskopischen Anatomi[e] des Menschen

Bearbeitet von

A. Benninghoff · M. Bielschowsky · S. T. Bok · J. Brodersen · H. v. Eggeling · R. Greving · G. Haegg[...]
V. v. Haller · A. Hartmann · R. Heiß · T. Hellman · G. Hertwig · H. Hoepke · A. Jakob · W. Ko[...]
J. Lehner · A. Maximow · G. Mingazzini · W. v. Möllendorff · V. Patzelt · H. Petersen · W. Pfuhl · B. Ro[...]
J. Schaffer · R. Schröder · S. Schumacher · E. Seifert · H. Spatz · H. Stieve · Ph. Stöhr · F. K. Studn[...]
A. v. Szily · E. Tschopp · C. Vogt · O. Vogt · F. Wassermann · F. Weidenreich · K. W. Zimmerm[...]

Querschnitt der Speiseröhre vom Erwachsenen in der Höhe des mittleren Drittels. MÜLLERS Fl.; Hämatox. + Eosin. Vergr. 10fach. *ep* Epithel; *gl* Schleimdrüse; *lp* Lamina propria; *mm* Muscularis mucosae; *su* Submucosa; *rm* Ringmuskulatur (rm_1 quergestreifte, rm_2 glatte Fasern derselben); bei ++ innere Längsmuskelbündel; *lm* Längsmuskulatur (lm_1 quergestreifte, lm_2 glatte Fasern derselben). (Nach SOBOTTA.)

Herausgegeben von Professor Dr. **Wilhelm v. Möllendorff**
Direktor des Anatomischen Instituts in Kiel

Inhaltsübersicht ...

Eine umfassende Darstellung der mikroskopischen Anatomie des Menschen ist seit der letzten Auflage des Koellikerschen Werkes nicht versucht worden. Die Tatsachenkenntnis ist aber seit dieser Zeit gewaltig gewachsen, wenngleich trotzdem eine befriedigende Anschauung in sehr vielen Gebieten noch nicht erreicht ist. Da der Kreis derjenigen, die zur Erweiterung und Vertiefung unseres Wissens vom gestaltlichen Bilde des menschlichen Körpers beitragen, fast unübersehbar groß ist, Veröffentlichungen morphologischer Tatsachen daher in den verschiedensten Zeitschriften erscheinen, ist es heute schon für den unmittelbar Interessierten sehr schwer, die Fortschritte zu verfolgen. Demjenigen aber, der morphologischer Arbeit fernsteht, fehlt ein Werk, in dem er sich zuverlässig über das Erreichte unterrichten kann.

Aus dieser Erwägung heraus unterzog sich der Herausgeber der Aufgabe, ein Handbuch der mikroskopischen Anatomie zustande zu bringen.

Übersicht über das Gesamtwerk

Erster Band: Die lebendige Masse

Die mikroskopische Untersuchung der lebendigen Masse und ihre Ergebnisse. Von G. Hertwig-Rostock, F. Wassermann-München, F. K. Studnička-Brünn, E. Tschopp-Basel.

Zweiter Band: Epithel-, Stütz- und Muskelgewebe, Bewegungsapparat

Erster Teil: **Das Epithel- und Drüsengewebe.** Von J. Schaffer-Wien. — **Bindegewebe und blutbildende Gewebe.** Von A. Maximow-Chicago. — **Blut.** Von J. Brodersen-Hamburg. *Erscheint im Mai 1927.*

Zweiter Teil: **Stützsubstanzen.** Von J. Schaffer-Wien und F. Weidenreich-Heidelberg. — **Muskelgewebe.** Von G. Haeggqvist-Stockholm. — **Bewegungsapparat.** Von H. Petersen-Würzburg und G. Haeggqvist-Stockholm.

Dritter Band: Haut- und Sinnesorgane

Erster Teil: **Die Haut.** Von H. Hoepke-Heidelberg. — **Die Milchdrüse.** Von H. v. Eggeling-Breslau. — **Geschmacksorgan.** Von W. Kolmer-Wien. — **Geruchsorgan.** Von W. Kolmer-Wien. — **Gehörorgan.** Von W. Kolmer-Wien. *Näheres auf Seite 6 dieses Prospektes.*

Zweiter Teil: **Sehorgan.** Von A. v. Szily-Freiburg i. B.

Vierter Band: Nervensystem

I. **Nervengewebe.** Ganglienzelle. Morphologie der Ganglienzelle. Zentrale Nervenfasern. Übersicht über den gegenwärtigen Stand der Neuronenlehre und der gegen sie erhobenen Einwände. Von M. Bielschowsky-Berlin. Neuroglia. Von H. Spatz-München. Die periphere Nervenfaser. Von Ph. Stöhr-Gießen. — II. **Das periphere Nervensystem.** Von Ph. Stöhr-Gießen. — III. **Das zentrale Nervensystem.** Die Hirnhäute und die epithelischen Gebilde des Gehirns. Von Graf V. v. Haller-Berlin. Einleitung. Von O. und C. Vogt-Berlin. **Das Rückenmark.** Von S. T. Bok-Utrecht. Medulla oblongata und Brücke. Mittelhirn. Von G. Mingazzini-Rom. Kleinhirn. Von A. Jakob-Hamburg. Zentrale Anteile des vegetativen Nervensystems. Von R. Greving-Erlangen.

Fünfter Band: Verdauungsapparat

Erster Teil: Die Mundhöhle. Von S. Schumacher-Innsbruck. — **Die Zunge.** Von S. Schumacher-Innsbruck. — **Die Speicheldrüsen der Mundhöhle und die Bauchspeicheldrüse.** Von K. W. Zimmermann-Bern. — **Der lymphatische Rachenring.** Von T. Hellman-Lund. — **Der Schlundkopf.** Von S. Schumacher-Innsbruck. — **Die Speiseröhre.** Von S. Schumacher-Innsbruck. — **Peritoneum einschl. Netz.** Von E. Seifert-Würzburg. *Näheres auf Seite 3 dieses Prospektes.*

Zweiter Teil: Die Zähne. Von J. Lehner-Wien. — **Der Magen.** Von J. Lehner-Wien. — **Der Darm.** Von V. Patzelt-Wien. — **Die Leber.** Von W. Pfuhl-Greifswald.

Sechster Band: Atmungsapparat, Gefäßsystem, Inkretorische Drüsen

Atmungsapparat. Von R. Heiß-Königsberg. — **Gefäßsystem.** a) Blutgefäße und Herz. Von A. Benninghoff-Kiel. — b) Organe des Lymphsystems. Von T. Hellman-Lund. — c) Milz. Von A. Hartmann-München. — **Die innersekretorischen Organe** (mit Ausnahme der Keimdrüse). Von B. Romeis-München.

Siebenter Band: Harn- und Geschlechtsorgane

Der Exkretionsapparat. Von W. v. Möllendorff-Kiel. — **Die männlichen Geschlechtsorgane.** Von H. Stieve-Halle. — **Die weiblichen Geschlechtsorgane.** Von R. Schröder-Kiel.

Als erster Teil erschien soeben:

Fünfter Band

Verdauungsapparat

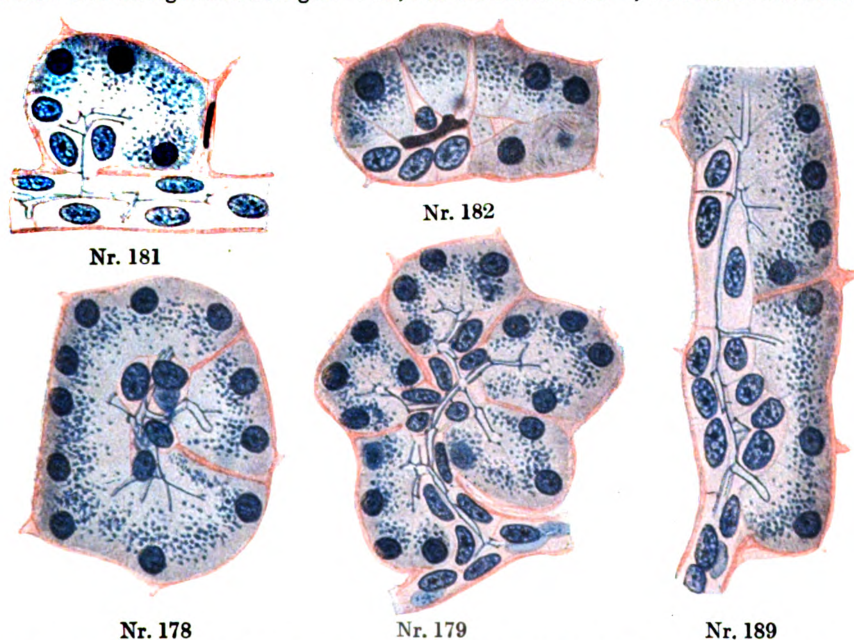
Erster Teil

Mundhöhle — Speicheldrüsen — Tonsillen — Rachen — Speiseröhre — Serosa

Bearbeitet von

T. Hellman-Lund · S. Schumacher-Innsbruck · E. Seifert-Würzburg
K. W. Zimmermann-Bern

Mit 276 zum Teil farbigen Abbildungen. VIII, 374 Seiten. RM 72.—; in Halblederband RM 78.—



19jähriger Hingerichteter. Sublimat, Eisenhämatox., Säurefuchsin. Isthmen bzw. centroacinäre Zellen hell. Die sezernierenden Zellen mit undeutlich gestreifter Basis. Schlußleisten schwarz. Vom Lumen der Isthmen bzw. centroacinären Zellgruppen dringen Sekretcapillaren zwischen die sezernierenden Zellen. Abb. 178. Pseudoacinus, d. h. ein Polymer mit unvollständiger Trennung in einzelne Adenomere, vielleicht auch durch teilweise Verwachsung primärer Hauptstücke entstanden, wodurch der eingeschlossene Isthmus zu den centroacinären Zellen wurde. Abb. 179. Isthmus dicht besetzt mit gut abgrenzbaren Hauptstücken. Abb. 180. Isthmus, nur an einer Seite mit zwei länglichen Hauptstücken besetzt. Abb. 181. Kurzer Seitenast eines Isthmus an der Abgangsstelle eingeschnürt. Abb. 182. Zwei Hauptstückzellen dringen zwischen Isthmuszellen bis zu dessen Lumen. Letzteres geschwärzt.

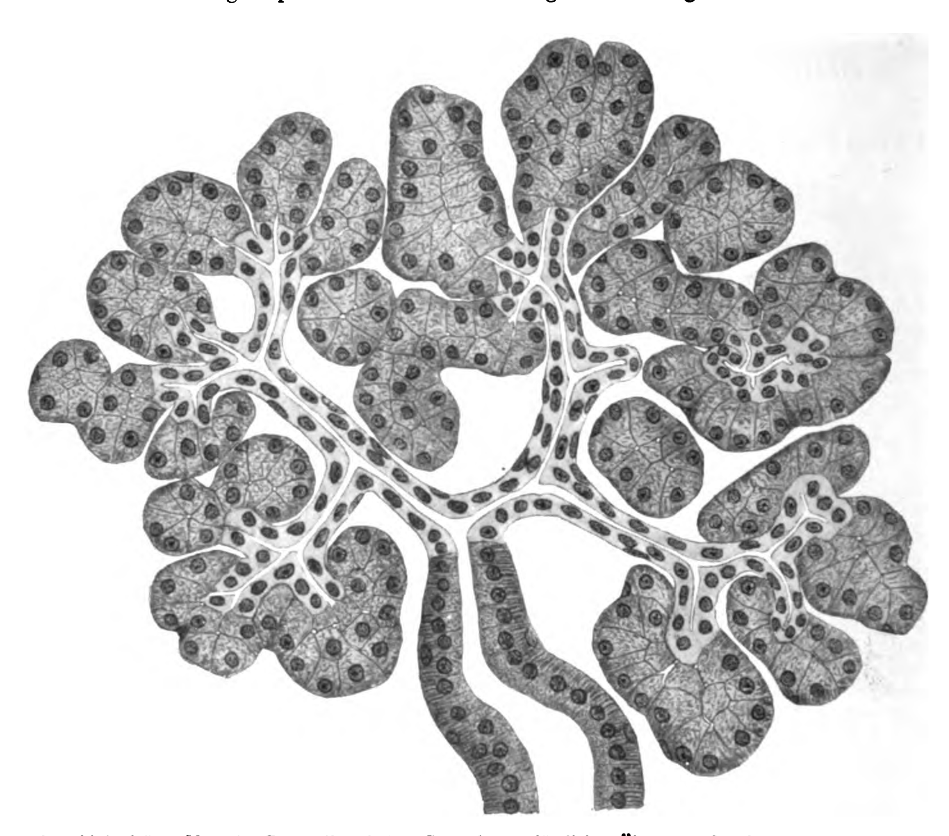
Inhaltsverzeichnis

C. Die Speicheldrüsen der Mundhöhle und die Bauchspeicheldrüse

Von Prof. Dr. K. W. Zimmermann-Bern

(Mit 186 Abbildungen)

Allgemeines. — I. Einteilung der Speicheldrüsen. — II. Die Form der Speicheldrüsen. A. Die Hauptstücke. 1. Endkomplexe gemischter Schläuche (»Halbmonde«). a) Die Ersatzzellentheorie. b) Die Phasentheorie. c) Die M. Heidenhainsche Adenomerentheorie. 2. Das Epithel der Hauptstücke. a) Die Eiweißzellen. α) Der Kern der Eiweißzellen. β) Das Mikrozentrum der Eiweißzellen. γ) Die Basallamellen. δ) »Trophospongium« und »Binnengerüst« der Eiweißzellen. ε) Die Plastosome der Eiweißzellen. ζ) Die Sekretgranula der Eiweißzellen. 1. Die Goldschmidtsche Chromidialtheorie. 2. Garniers Ergastoplasmatheorie 3. Beziehung des »Binnengerüstes« zur Sekretion. 4. Die

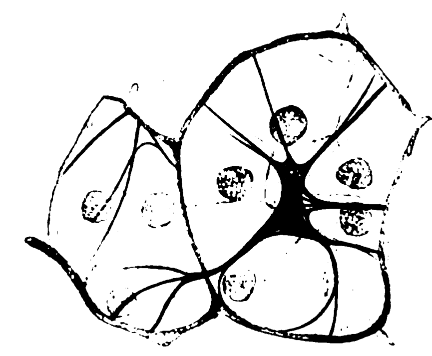


Unterkieferdrüse, Mensch. Rein albuminöses Läppchen, plötzlicher Übergang des Streifenstücks in die Isthmen. Regelmäßige und gleichmäßige, meist dichotomische Verzweigung. Nur wenige Hauptstücke besitzen Weinbeerform, und diese sind vielleicht nur Teile langgestreckter Gebilde. Keine kammerartigen Erweiterungen des Lumens sondern nur ganz feine sicher verzweigte Sekretkapillaren, also keine Alveoli.

Plastome als Quelle der Sekretbildung in den albuminösen Zellen. 5. Die fertigen Zymogengranula der albuminösen Zellen. 6. Wasserabsonderung und Ortsveränderung der Sekretgranula in den Eiweißzellen. Exkretion. η) Die Verbindung der albuminösen Zellen miteinander. b) Die Schleimzellen. α) Besonderheiten der Schleimzellen. β) Der Kern der Schleimzellen. γ) Die Zentrierung der Schleimzellen. δ) Besitzen die Schleimzellen Basallamellen? ε) Das Trophospongium oder Binnengerüst der Schleimzellen. ζ) Die Plastosome der Schleimzellen. η) Sekretion und Exkretion der Schleimzellen. ι) Die Verschleimungstheorie M. Heidenhains. c) Fetttröpfchen in den Zellen der Speicheldrüsen. d) Pyknocyten. e) Die Basalzellen (Korbzellen, Myoepithelzellen). B. Die Abflußwege der Speicheldrüsen. 1. Exkretwege der Hauptstücke. 2. Das Ausführungsgangsystem der Speicheldrüsen. a) Die Isthmen oder Halsstücke. b) Die Streifenstücke. c) Die Ausführungsgänge der Mundhöhlendrüsen im engeren Sinne. C. Regenerationserscheinungen an den Epithelzellen der Speicheldrüsen. D. Das Bindegewebe der Mundspeicheldrüsen. E. Die Blutgefäße der Mundspeicheldrüsen. F. Der Lymphapparat der Speicheldrüsen. G. Die Nerven der Mundspeicheldrüsen.

Spezieller Teil.

I. Die Drüsen des Vorhofs der Mundhöhle. A. Ohrspeicheldrüse (Glandula), Parotis. B. Die Lippen- und Wangendrüsen. 1. Die Lippendrüsen, Gl. labiales superiores et inferiores. 2. Die Wangendrüsen, Gl. buccales. II. Die Drüsen der Mundhöhle im engeren Sinne. A. Drüsen am Boden der Mundhöhle, Glandulae glossomandibulares. 1. Die Unterkieferdrüse, Glandula mandibularis (submaxillaris). 2. Die Unterzungendrüsen, Gl. sublinguales. 3. Die zusammengesetzten Mundbodendrüsen, Glandulae glossomandibulares compositae. B. Die Drüsen der Zunge, Gl. linguales. 1. Die vorderen Zungendrüsen, Gl. linguales anteriores. 2. Die hinteren Zungendrüsen, Gl. linguales posteriores. a) Die albuminösen Zungendrüsen. b) Die Schleimdrüsen des Zungengrundes. C. Die unteren Gaumendrüsen. — III. Die »Bermannschen« rudimentären und atrophischen Drüsen. IV. Der Speichel. – V. Die Bauchspeicheldrüse. – VI. Diagnostik d. vier wichtigsten Speicheldrüsen. — Literatur.



Parotis, 19jähriger Hingerichteter. Sternförmige basale Myoepithelzelle (Korbzelle) mit sich teilweise überkreuzenden Fibrillen. Sublimat. Eisenhämatoxylin. Aus K. W. ZIMMERMANN (1898).

D. **Der lymphatische Rachenring.** (Der Waldeyersche Schlundring. Die Tonsillen. Der lymphoepitheliale Schlundring.) Von Prof. Dr. T. Hellman-Lund. (Mit 21 Abbildungen)

I. Allgemeines. — II. Morphologie. 1. Die Gaumentonsillen (Tonsillae palatinae. Die Gaumenmandeln. Die Mandeln). 2. Die Zungentonsille (Die Zungenmandel. Tonsilla lingualis). 3. Die Rachentonsillen (Die Pharynxtonsille. Die Rachenmandel. Luschkas Tonsille). 4. Die Lymphbahnen. III. Embryologie. — IV. Altersanatomie. — V. Vergleichende Anatomie — VI. Physiologie — Literatur.

E. **Der Schlundkopf.** Von Prof. Dr. S. Schumacher-Innsbruck. (Mit 4 Abbildungen)

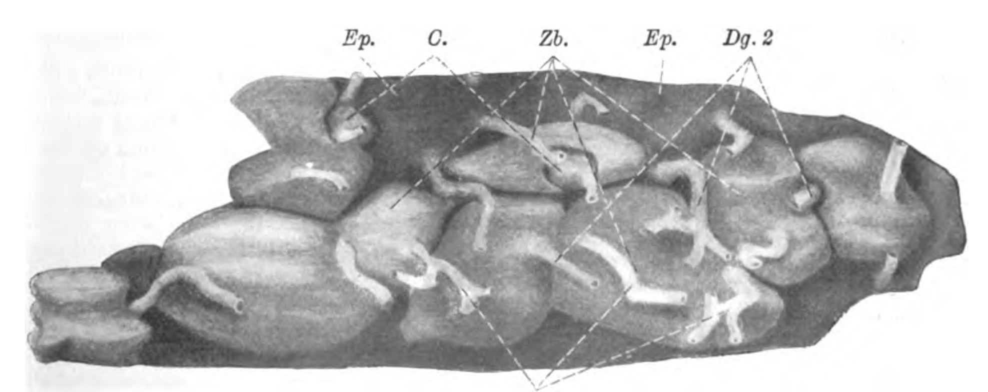
I. Allgemeines. Einteilung. Abgrenzung. — II. Bau der Wandung. — III. Drüsen und lymphoides Gewebe. — IV. Blut- und Lymphgefäße.

F. **Die Speiseröhre.** Von Prof. Dr. S. Schumacher-Innsbruck. (Mit 19 Abbildungen)

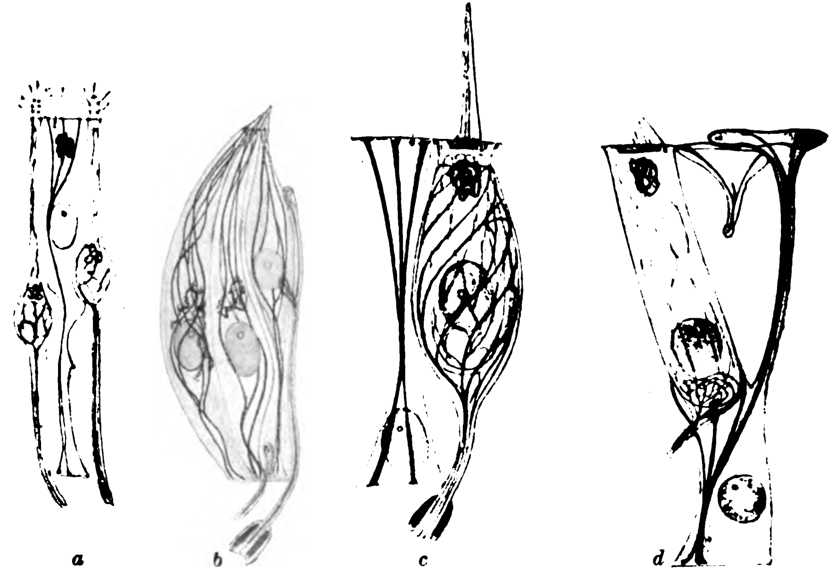
I. Allgemeiner Bauplan. Abgrenzung. — II. Epithel. — III. Drüsen. 1. Glandulae oesophagae. 2. Kardiale Oesophagusdrüsen. Magenschleimhautinseln. — IV. Lamina Propria. Lymphoides Gewebe. — V. Muscularis mucosae. — VI. Submucosa. Elastisches Gewebe. — VII. Tunica muscularis. VIII. Tunica adventitia. — IX. Blut- und Lymphgefäße. — Literatur (Schlundkopf und Speiseröhre).

G. **Peritoneum einschließlich Netz.** Von Prof. Dr. E. Seifert-Würzburg. (Mit 21 Abbildungen)

I. Peritoneum parietale et viscerale. — II. Omentum majus. — III. Omentum minus, Mesenterium, Mesangien und Ligamente. — IV. Pathologie. — Literatur. — **Namen- und Sachverzeichnis.**



Rekonstruktion nach BORN in 33facher Vergrößerung einiger Zungenbälge eines erwachsenen Mannes um die Ausmündungsstellen der Drüsenausführungsgänge zu zeigen, von vorn und unten gesehen. Abb. 1/3. *C.* Cystöse Erweiterungen der Drüsenausführungsgänge gerade unter dem Oberflächenepithel; *Dg. 1* Drüsenausführungsgänge, die in die Tonsillarkrypten münden (nicht schattiert); *Dg. 2* Drüsenausführungsgänge, die zwischen den Zungenbälgen münden (schattiert); *Ep.* Zungenepithel; *Zb.* Zungenbälge.



Schema des Verhaltens von Stützfibrillen, Neurofibrillen, Diplosomen und Geißeln, sowie Netzapparat in den Sinnes- und Stützzellen *a* des Geruchsorgans, *b* des Geschmacksorgans, *c* der Vorhofendapparate, *d* des CORTIschen Organs.

Im April erscheint: **Dritter Band**

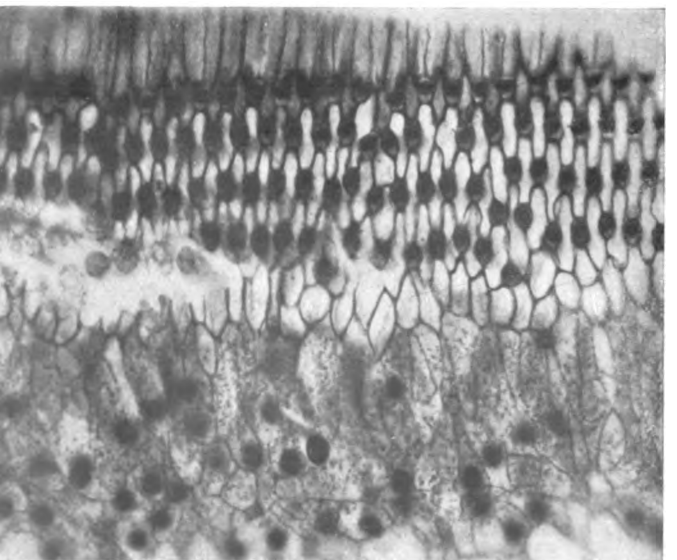
Haut und Sinnesorgane

Erster Teil

Haut — Milchdrüse — Geschmacksorgan — Geruchsorgan — Gehörorgan

Bearbeitet von H. Hoepke-Heidelberg, H. v. Eggeling-Breslau, W. Kolmer-Wien

Mit 322 zum Teil farbigen Abbildungen. Etwa 500 Seiten. Etwa RM 75.—; in Halblederband etwa RM 81.—



Flachschnitt der Oberfläche des CORTIschen Organes des Erwachsenen, die Membrana reticularis darstellend. Vergr. 500fach. Von unten nach oben: HENSENsche. DEITERSsche Zellen (hell) und Haarzellenköpfe (dunkel), Pfeilerköpfe.

A. Die Haut

Von

Hermann Hoepke-Heidelberg

(Mit 41 Abbildungen)

I. Die Epidermis. 1. Stratum germinativum. 2. Stratum granulosum. 3. Stratum lucidum. 4. Stratum corneum. 5. Das Endstück des Schweißdrüsen-Ausführungsganges in der Epidermis. 6. Die Bedeutung der Tonofibrillen. 7. Die Tonofibrillen im polarisierten Licht.

II. Das Corium. 1. Basalmenbran. 2. Kollagene Fibrillen. 3. Elastische Fibrillen und Netze. 4. Die Gitterfasern. Muskulatur. a) Arrectores pilorum. b) Muscularis sexualis. c) Musculi tensores cuti obliqui. 5. Die Mastzellen.

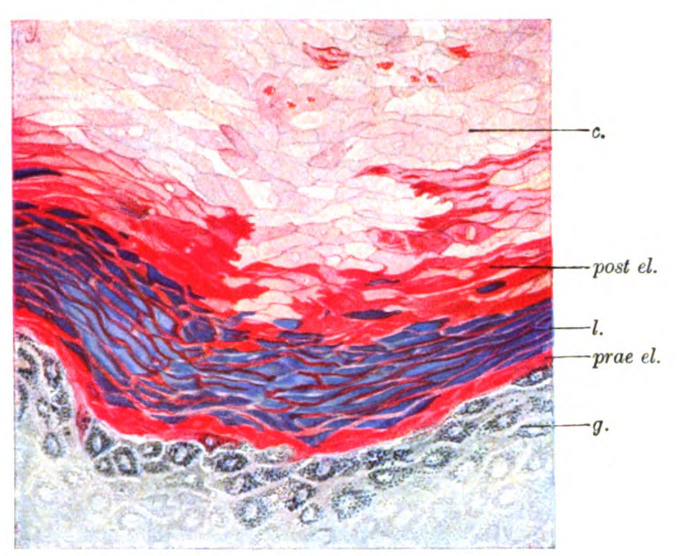
III. Das subcutane Fettgewebe. — IV. Pigment.

V. Die Drüsen der Haut. Historisches. 1. Die Talgdrüsen. 2. Freie Talgdrüsen. 3. Zyklisc Schwankungen der apokrinen und Talgdrüsen.

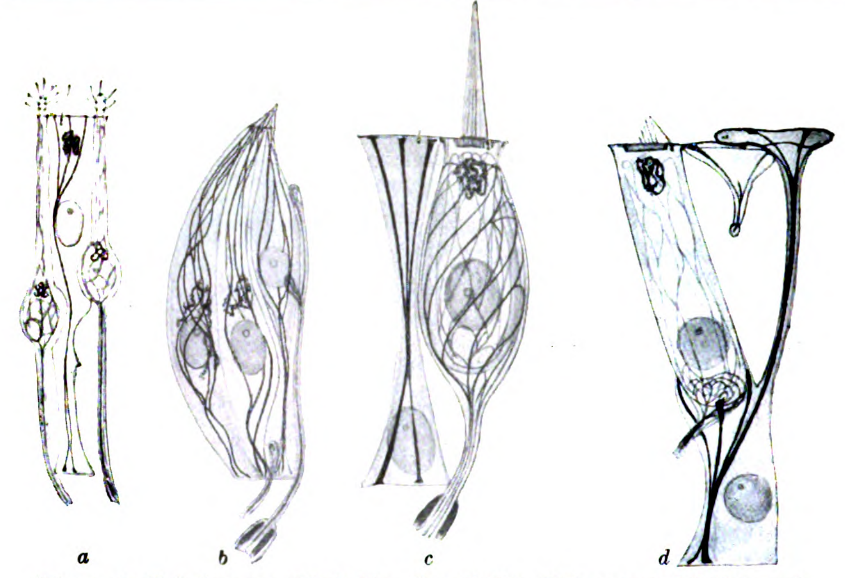
VI. Die Haare. Die äußere Wurzelscheide und der bindegewebige Haarbalg. 2. Bulbus u Papille. 3. Der mittlere Teil der Haarwurzel. 4. Verschiedene Gonosomen. 5. Der Haarwechs 6. Haarfarbe und Ergrauen. 7. Wachstumsgeschwindigkeit und Lebensdauer der Haare. Haargruppe Haarstrich, Haarstrom, Haarwirbel, Haarkreuze. 8. Haare in polarisiertem Licht.

VII. Nägel.

VIII. Die Gefäße der Haut. 1. Die Blutgefäße. a) Arterien. b) Venen. c) Die Capillare d) Arterio-venöse Anastomosen. 2. Die Lymphgefäße. — Literatur.



Nach einem Präparat von MARTINOTTI. Gefrierschnitt von Sohlenhaut. Färbung: Viktoriaviolett-Infrosin. Darstellung der Grenzschichten des Str. lucidum (*l*) ellidinicum Martinotti. *g*. Str. granulosum. *prae el.*, *post el.* Str. prae- post ellidicums. *c*. Str. corneum. Zeiß Apochr. 8 mm. Ok. K. 6. Vergrößerung 270fach.



Schema des Verhaltens von Stützfibrillen, Neurofibrillen, Diplosomen und Geißeln, sowie Netzapparat in den Sinnes- und Stützzellen *a* des Geruchsorgans, *b* des Geschmacksorgans, *c* der Vorhofendapparate, *d* des CORTIschen Organs.

Im April erscheint: **Dritter Band**

Haut und Sinnesorgane

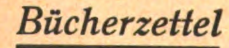
Erster Teil

Haut — Milchdrüse — Geschmacksorgan — Geruchsorgan — Gehörorgan

Bearbeitet von H. Hoepke-Heidelberg, H. v. Eggeling-Breslau, W. Kolmer-Wien

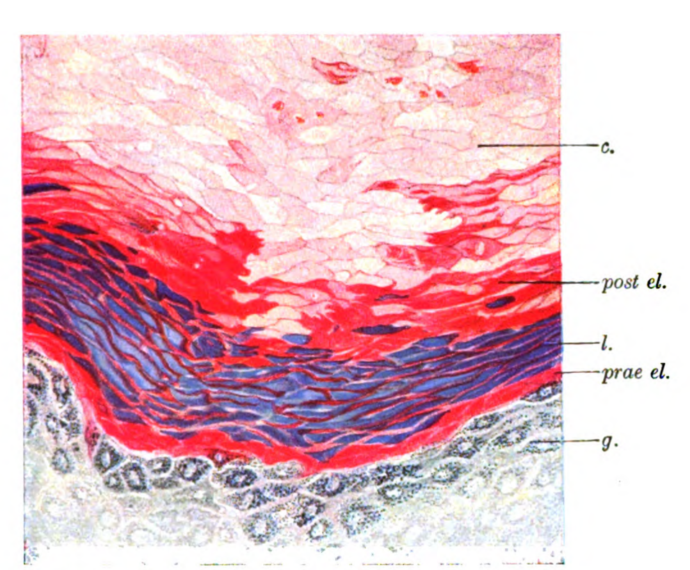
Mit 322 zum Teil farbigen Abbildungen. Etwa 500 Seiten. Etwa RM 75.—; in Halblederband etwa RM 81.—

A. Die Haut



An die Buchhandlung

lachsch
rana ret
DE



Nach einem Präparat von MARTINOTTI. Gefrierschnitt von Sohlenhaut. Färbung: Viktoriaviolett-Infrosin. Darstellung der Grenzschichten des Str. lucidum *(l)* ellidinicum Martinotti. *g.* Str. granulosum. *prae el., post el.* Str. prae- post ellidicums. *c.* Str. corneum. Zeiß Apochr. 8 mm. Ok. K. 6. Vergrößerung 270fach.

B. Die Milchdrüse

Von H. v. Eggeling-Breslau

(Mit 19 Abbildungen)

C. Geschmacksorgan

Von Walter Kolmer-Wien

(Mit 40 Abbildungen)

Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen

Herausgegeben von Professor Dr. W. v. Möllendorff

D. Geruchsorgan

Von Walter Kolmer-Wien

(Mit 56 Abbildungen)

1. Lage und Abgrenzung der Riechregion. 2. Die Sinneszellen. 3. Stützelemente und übrige Bestandteile. 4. Innervation. 5. Nervus terminalis. 6. Beziehungen der Blut- und Lymphgefäße zur Riechschleimhaut. 7. Vitalfärbung. 8. Das Jakobson'sche Organ, Organon vomero-nasale. 9. Entwicklung der Regio olfactoria. 10. Degeneration, Regeneration und Transplantation der Riechschleimhaut. 11. Zur vergleichenden Histologie der Riechschleimhaut. 12. Physiologische Bemerkungen. 13. Bemerkungen zur Pathologie der Regio olfactoria.



Neubildung eines Haares. Kopfhaut eines 22jähr. Mannes. Nach Serienschnitten rekonstruiert. Zeiß Obj. 8. Apochr. Comp. Okt. 4 Vergr. 196fach.

E. Gehörorgan. Von Walter Kolmer-Wien. (Mit 166 Abbildungen)

I. Das äußere Ohr. 1. Ohrmuschel. 2. Äußerer Gehörgang. 3. Trommelfell: Mikroskopischer Aufbau. Nerven des Trommelfells. Blutgefäße. — II. Mittelohr. 1. Paukenhöhle: Aufbau der Wandung der Paukenhöhle und ihrer Nebenräume. Gehörknöchelchen. Binnenmuskeln des Ohres, Gefäße und Nerven der Paukenhöhle. 2. Tuba Eustachii. — III. Inneres Ohr. 1. Häutiges Labyrinth: Säckchen. Utriculus. Sacculus. Bogengänge. Lage und Größenverhältnisse. Epithel der Bogengänge. 2. Allgemeine Epithelauskleidung. Cristae ampullarum. 3. Macula neglecta oder Crista quarta. Ductus und Saccus endolymphaticus. Perilymphatisches Gewebe. Pigment. Innervation des Vorhofabschnittes. Schnecke. Modiolus und Scalen. Ductus cochlearis. Allgemeine Lage- und Größenverhältnisse. Papilla basilaris oder Cortisches Organ. Haarzellen. Stützelemente. Basilarmembran. Membrana tectoria. Stria vascularis. Hörzahn und Limbus spiralis. Innervation der Schnecke. Gefäße des Labyrinthes. Verhalten des Gehörorgans bei Vitalfärbung. Lymphräume. — IV. Entwicklung des Gehörorgans. Entwicklung des äußeren Ohres. Entwicklung des Mittelohres. Entwicklung des Gehörknöchelchens. Entwicklung des Labyrinths. Entwicklung des Vestibularapparates. Entwicklung der Otolithen. Entwicklung der Schnecke. Entwicklung der Membrana tectoria (Corti). Entwicklung der Innervation des Ohres. Entwicklung der perilymphatischen Räume. Entwicklung der Teile des Felsenbeines. — V. Vergleichend-histologische Bemerkungen. — VI. Physiologische Bemerkungen.

entnehmen. Ist zunächst nur anorganisches Phosphat und Monoester vorhanden, so folgt aus dem Gleichbleiben des Phosphatgehalts während der Milchsäurebildung, daß ebensoviel Zucker des Monoesters in Di-Ester übergegangen ist, wie in Milchsäure zerfällt. Verschwindet obendrein anorganisches Phosphat, so geht ein weiterer Teil, der äquimolekular mit dem verschwindenden Phosphat ist, in Di-Ester über. Die Bildung von 1 Mol. Milchsäure verbraucht daher a) $^1/_2$ Mol. Monoester direkt, b) $^1/_2$ Mol. durch Übergang in Di-Ester. Verschwindet daneben noch 1 Mol. anorganisches Phosphat, so wird noch c) ein weiteres Molekül Monoester umgewandelt. Hierbei entstehen 1½ Mol. Hexosediphosphat, enthaltend 3 Mol. verestertes Phosphat. Als Beispiel für die Berechnung der Verteilung und der Veresterungskorrektur seien die folgenden Versuchsdaten gegeben:

Versuch 1.

9. Oktober 1926 (Abb. 7, Tabelle VIII, Nr. 1).

Je 3,3 ccm mit 0,5 ccm m/12 *Neuberg*-Ester, enthaltend 7,5 mg Zucker und 2,9 mg P_2O_5 (organisch), geben in 15 Minuten (Tabelle VIII, 1a) manometrisch 2,15 mg Milchsäure (unkorrigiert), chemisch 2,38 mg Milchsäure; in 60 Minuten (1b) manometrisch 2,74 mg Milchsäure, chemisch 2,69 mg; anorganisches P_2O_5 vorher 1,67 mg, nach 15 Minuten 0,705 mg, nach 60 Minuten 1,005 mg.

Daraus berechnet in 3,3 ccm: Milligramme P_2O_5	$C_{A\,I}$	1,67
	$C_{M\,I}$	2,9
	$C_{D\,I}$	0
Für (1a) C_{II}-Werte	$C_{A\,II}$	0,705
	$C_{M\,II}$	0,10
	$C_{D\,II}$	3,73
Für (1b) C_{II}-Werte	$C_{A\,II}$	1,04
	$C_{M\,II}$	0,16
	$C_{D\,II}$	3,37

Unter Einsetzen in die Formel ergibt sich für

$$(1a)\ \Delta p_H = 6{,}62 - 6{,}44 = 0{,}18,$$
$$(1b)\ \Delta p_H = 6{,}62 - 6{,}50 = 0{,}12.$$

Die Pufferkapazität entspricht (berechnet aus dem Mittel der Nenner) 1,7 mg P_2O_5 (für $\beta = 1$); das Milchsäureäquivalent für Δp_H 0,18 ist danach $1{,}8 \times 0{,}075 \times 1{,}7$ mg Milchsäure = 0,23 mg, für Δp_H 0,12 entsprechend 0,15 mg Milchsäure.

Korrigiert ergibt sich danach in dem manometrischen Versuch für 1a 1,92 mg, für 1b 2,59 mg. Auf diese Weise sind die Veresterungskorrekturen der Versuche der Tabelle VIII berechnet. Daraus erhellt aber, daß die Veresterungskorrektur einerseits ziemlich gering ist, da ja die Dissoziationskonstante des entstehenden Diphosphats zwischen dem des verschwindenden anorganischen und Monophosphats liegt; ferner aber im Vergleich mit den chemischen Bestimmungen, daß die korrigierten Werte durchschnittlich nicht besser mit den chemischen übereinstimmen als die unkorrigierten, sondern öfter sogar weniger gut. (Vielleicht liegt dies an den verhältnismäßig hohen Druckänderungen bei Zugabe des Esters, die durch nicht vollkommene Neutralisierung auf p_H 7,4 hervorgerufen sind.) Infolgedessen wurde bei den gewöhnlichen Versuchen auf die Anbringung der Veresterungskorrektur verzichtet. Eine starke Verschiebung der Wasser-

Tabelle VIII.

Vergleich der manometrischen und chemischen Milchsäuremessung beim Umsatz der Monoester.

A. Manometrische Messung.

Nr.	Datum 1926	Gesamtflüssigkeit	Vorhandener Monoester in mg Zucker *)	Zusätze	Versuchszeit Min.	h in mm Brodie	k_{CO_2}	Korrektur für Einkippen: cmm CO_2	Retentionsfaktor	cmm CO_2 manometrisch
1 a	9. X.	3,2	7,5 *N.*	—	15	298,5	1,56	— 43	1,27	423
b	9. X.	3,2	7,5 *N.*	—	60	415,5	1,40	— 43	1,27	539
c	9. X.	3,2	7,5 *N.*	2×10^{-2} NaF	15	163,5	1,64	— 43	1,27	307
2	2. XI.	3,25	4,5 *N.*	—	45	383,5	1,56	— 78	1,19	620
3	8. XI.	3,2	10,9 *R.*	—	60	384	1,40	— 60	1,20	574
4 a	10. XI.	3,2	7,2 *N.*	—	50	324,5	1,56	— 117	1,13	440
b	10. XI.	3,2	7,2 *R.*	—	50	331,5	1,40	— 75	1,13	440

*) *N.*: *Neuberg*, *R.*: *Robison*.

B. Phosphat- und chemische Milchsäurebestimmung.

Nr.	P_2O_5		Chemische Milchsäurebestimmung			Monoester in mg P_2O_5		Hexosediphosphorsäure gebildet in mg P_2O_5	Δp_H berechnet	Veresterungskorrektur in mg Milchsäure	Manometrische Milchsäure	
	Anfang	Änderung	Anfangsgehalt	nachher	Zunahme	Anfangsgehalt	verschwindend				unkorrigiert	korrigiert
1 a	1,67	— 0,965	0,594	2,97	**2,88**	2,9	2,8	3,71	— 0,18	— 0,23	**2,15**	**1,92**
b	1,67	— 0,665	0,594	3,28	**2,69**	2,9	2,75	3,37	— 0,12	— 0,15	**2,74**	**2,59**
c	1,67	— 0,90	0,594	0,75	**0,16**	2,9	1,03	1,92	— 0,16	— 0,16	**(0,90)**	**(0,70)**
2	2,32	+ 0,85	1,11	4,10	**2,99**	1,75	1,75	0,90	+ 0,02	+ 0,03	**2,82**	**2,85**
3	2,04	— 1,20	0,27	1,91	**1,64**	4,25	2,49	3,69	— 0,19	— 0,28	**1,90**	**1,62**
4 a	1,84	— 0,63	0,49	2,46	**1,97**	2,8	2,17	2,8	— 0,15	— 0,19	**1,77**	**1,58**
b	1,84	— 0,35	0,49	2,42	**1,98**	2,8	1,86	2,21	— 0,10	— 0,13	**1,77**	**1,64**

stoffzahl tritt dagegen in Gegenwart von Fluorid ein. Das ergibt sich schon aus der Rechnung bei Berücksichtigung des Umstandes, daß in Gegenwart von Alkalisalz in m/10 und höherer Konzentration die pK'-Werte für Mono- und Di-Ester sich einander nähern. Einige Versuche (ohne Bicarbonatzusatz) werden später mitgeteilt (S. 150). Hier jedoch ist umgekehrt die tatsächlich gemessene Säuerung noch größer, als sich aus den obigen Näherungsannahmen berechnet.

C. Verlauf der Milchsäurebildung und des Phosphatumsatzes.

Der Verlauf der Spaltung und des Phosphatumsatzes ist in einigen Versuchen und Kurven wiedergegeben, wobei wie in den letzten Arbeiten die Milchsäurebildung nach oben, die Phosphatveresterung in gleichem Maße (äquimolekular zur gebildeten Milchsäure, 1,00 mg Milchsäure = 1,09 mg H_3PO_4) nach unten aufgetragen ist, so daß die Abspaltung des Phosphats in gleicher Richtung wie die Milchsäurebildung geht. Bei glattem Zerfall der Hexosemonophosphorsäure sollte auf 2 Mol. Milchsäure 1 Mol. Phosphorsäure frei werden.

1. Umsatz des Neubergschen Esters.

Der Umsatz ist in den Abb. 3 bis 10, ferner in 12, sowie in der Tabelle IX angegeben. Der Verlauf des Phosphatumsatzes ist durch eine Reihe von Parallelversuchen ermittelt. Die Milchsäurewerte geben das Mittel der verschiedenen Parallelbestimmungen an.

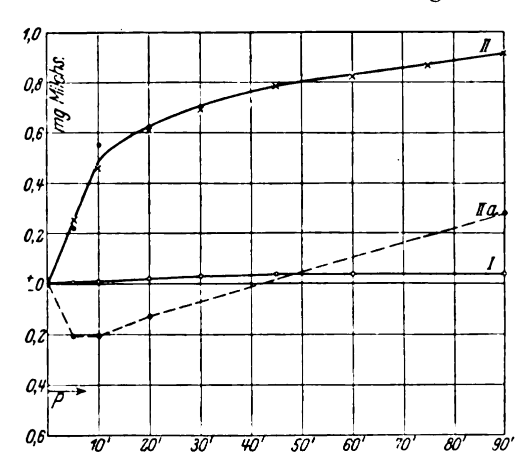


Abb. 3. Verlauf der Milchsäurebildung und des Phosphatumsatzes bei Spaltung des *Neuberg*schen Esters. Versuch: 1. X. 1926, Tabelle IX, 1 a, c, d, e, f. Milligramm Milchsäure nach oben, Veresterung des anorganischen Phosphats äquimolekular zur Milchsäure nach unten aufgetragen. Der Pfeil bei P entspricht dem Gehalt der Lösung an anorganischem Phosphat; der Phospatgehalt am Nullpunkt der Abzisse ist der des Ausgangszustandes; das Aufsteigen der Phosphatkurve bedeutet Bildung von anorganischem Phosphat durch Esterspaltung.

○——○ I: Milchsäurebildung ohne Zusatz.
●×—●× II: Milchsäurebildung aus Monoester, enthaltend 2 mg Zucker.
●- - - -● IIa: Zugehörige Kurve des Phosphatumsatzes.

Veresterung des anorganischen Phosphats während der raschen Glykolysephase; Abspaltung von Phosphat während der langsamen, ungefähr äquimolekular zur gebildeten Milchsäure.

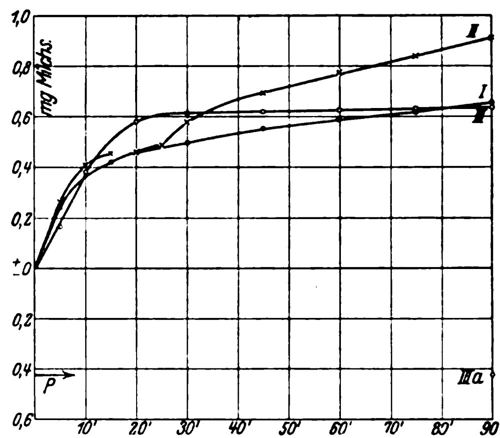


Abb. 4. Verlauf der Milchsäurebildung bei verschiedenen Mengen Monoesterzusatz. Versuch: 1. X. 1926. Tabelle IX, 1 b, g, h, i. Anordnung wie in Abb. 3.

●———● I: Milchsäurebildung des zugesetzten Monoesters, enthaltend 1,0 mg Zucker.

×———× II: In den ersten 15 Minuten Parallelversuch zu I, dann nochmals Monoester mit 1 mg Zuckergehalt zugesetzt. 5 Minuten Unterbrechung der Ablesung, darauf folgend neuer Anstieg, so daß nach 90 Minuten 0,92 mg Milchsäure gebildet sind, ebensoviel wie in Abb. 3; Kurve II aus der gleichen Menge Monophosphorsäure.

○———○ III: Milchsäurebildung aus zugesetztem Monoester mit 4 mg Zuckergehalt. Entsprechend der höheren Esterkonzentration ist der Umsatz anfangs größer, sinkt aber nach etwa 20 Minuten auf fast 0, wegen totaler Veresterung des anorganischen Phosphats. Punkt IIIa am Versuchsende zeigt die Abwesenheit des anorganischen Phosphats an.

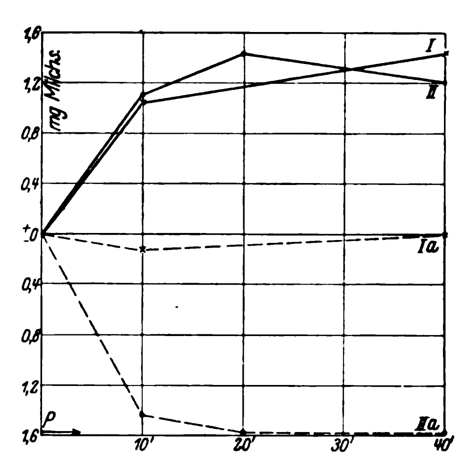


Abb. 5. Milchsäurebildung (chemisch bestimmt) und Phosphatveresterung bei Zusatz verschiedener Mengen Monoester. Versuch 2. X. 1926.

×———× I: Bildung von Milchsäure in 3 ccm Flüssigkeitsgemisch, enthaltend Monoester mit 4,6 mg Zucker.

× - - - × Ia: Dazugehörige Kurve der Phosphatveresterung.

●———● II: Bildung von Milchsäure aus der doppelten Monoestermenge. Nach 20 Minuten hört der Anstieg der Milchsäurebildung auf (die Abnahme der Milchsäure um etwa 10 % des Gesamtgehalts liegt an Ungenauigkeiten der Bestimmung).

● - - - ● IIa: Die zugehörige Kurve des Phosphatverlaufs zeigt, daß schon nach 10 Minuten das anorganische Phosphat nahezu, nach 20 Minuten total verschwunden ist.

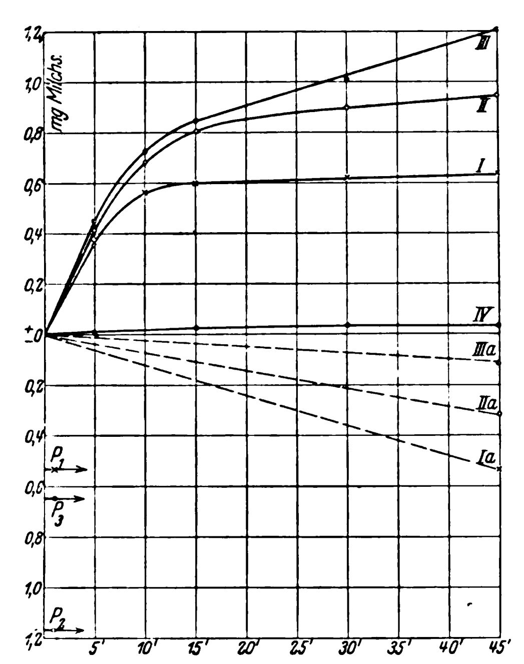


Abb. 6. Milchsäurebildung und Phosphatumsatz aus der gleichen Monoestermenge (enthaltend 3,6 mg Zucker) bei wechselndem Zusatz von anorganischem Phosphat.
Versuch: 5. X. 1926. Tabelle IX, 2a, b, c, d.

×—×- -× I und Ia: Ohne Phosphatzusatz. Der Anstieg hört nach etwa 15 Minuten auf, da das anorganische Phosphat entsprechend P_1 ⟶ verschwunden ist.

○——○ II: Mit 0,1 ccm m/15 Phosphatzusatz (= 0,5 mg P_2O_5). Am Schluß ist nur ein geringer Teil des vorhandenen Phosphats (P_2 ⟶) verschwunden.

◐——◐ III: Zusatz von wenig Phosphat (0,14 mg P_2O_5) entsprechend P_3 ⟶ und Hefeaktivator. (Die Milchsäurebildung fällt hier am wenigsten ab).

●——● IV: ohne Zusatz.

Die verschieden starke Veresterung scheint hauptsächlich an der Verschiedenheit der benutzten Präparate des *Neuberg*-Esters zu liegen. Die in einigen Fällen beobachtete geringe Veresterung mit frühem Stillstand des Prozesses (z. B. Versuch 4) dürfte auf das weniger reine Präparat zurückzuführen sein. Bei raschem Umsatz ist auch die Veresterung meist sehr groß. Wie erwähnt, kommt der Prozeß bei restlosem Verbrauch des anorganischen Phosphats zum Stillstand. In diesem Falle kann durch Phosphatzusatz der Umsatz erhöht werden (siehe Versuch 2b, c Abb. 8). Ähnlich wirkt öfters der Zusatz von Hefeaktivator; doch ist es möglich, daß mit seiner Hilfe hydrolytisch abgespaltene Hexosen zusätzlich umgesetzt werden. Daß die Geschwindigkeit des Umsatzes in der ersten Phase etwa gleich groß ist wie die der Glucose, ergibt sich aus Versuch 3b und 3c. Dies ist von Wichtigkeit, da so der Monoester die Bedingungen für den hypothetisch angenommenen naszierenden Ester bei der Hexosespaltung erfüllt.

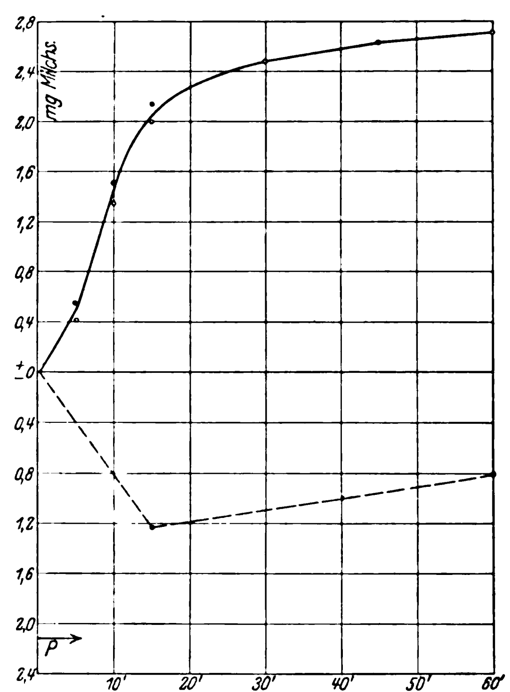


Abb. 7. Totalumsatz von *Neuberg*schem Ester. Versuch: 9. X. 1926. Tabelle VIII 1a und b. Umsatz von *Neuberg*schem Ester, enthaltend 7,5 mg Zucker in 3,2 ccm Fermentgemisch während einer Stunde. Nach 15 Minuten ist bereits teils durch Milchsäurebildung, teils durch Veresterung der zugesetzte Monoester umgesetzt, so daß die Geschwindigkeit abfällt. Die Milchsäurebildung der zweiten Periode ist ungefähr äquimolekular mit dem wieder abgespaltenen Phosphat. Milchsäure chemisch und manometrisch bestimmt.

●○—○● Milchsäurebildung. ● - - - - ● Phosphatumsatz.

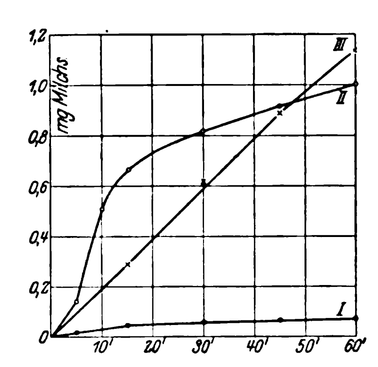


Abb. 8. Vergleich der Milchsäurebildung aus Glucose und Monoester.

●——— Kurve I: Kontrolle ohne Zusatz,
○———○ „ II: *Neuberg*scher Ester.
×———× „ III: Glucose + Hefeaktivator.

Versuch: 12. X. 1926. Tabelle IX, 3a, b, c.

Da die Umsatzgeschwindigkeit der Glucose von der Aktivatormenge abhängt, beweist der Versuch nur, daß die Anfangsgeschwindigkeit des Monoesterzerfalls mindestens so groß ist wie die der Glucose im aktivierten Muskelextrakt.

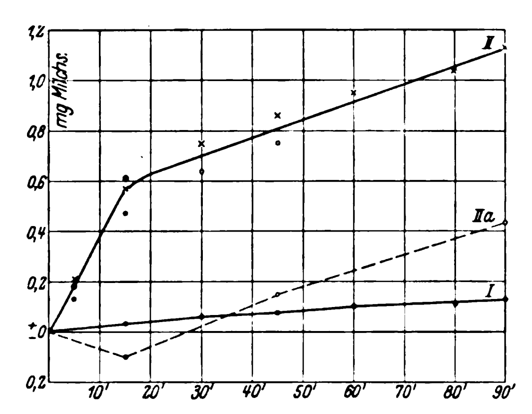


Abb. 9. Unvollständiger Umsatz der Monoester. Versuch: 28. X. 1926. Tabelle IX, 4a, b, c, d.
●———● Kurve I: Kontrolle ohne Kohlehydratzusatz.
×○◑—◑○× „ II: Milchsäurebildung aus Monoester mit 6,0 mg Zuckergehalt.
○– – – – –○ „ IIa: zugehöriger Phosphatumsatz.
Der Geschwindigkeitsabfall findet schon nach 15 Minuten statt, ehe der Monoester umgesetzt ist. Auch hier fällt der Abfall der Geschwindigkeit mit dem Aufhören der Veresterung zusammen, und die Milchsäurebildung der zweiten Periode ist äquimolekular zum aufgespaltenen Phosphat, wie die Parallelität der Kurven II und IIa zeigt.

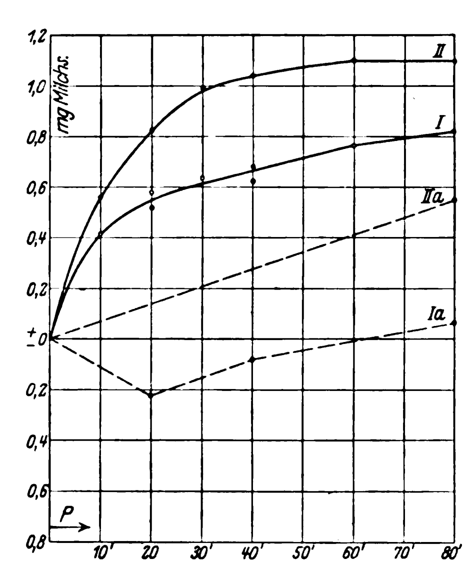


Abb. 10. Steigerung des Monoesterzerfalls durch Natriumarseniat. Versuch: 9. XI. 1926. Tabelle IX, 5b, c, d, e.
●○———●○ I: Milchsäurebildung ohne Natriumarseniat.
● – – – – ● Ia: Zugehöriger Phosphatumsatz.
◐———◐ II: Milchsäurebildung mit 6 . 10^{-4} mol. Natriumarseniat.
◐ – – – – ◐ IIa: Zugehöriger Phosphatumsatz.
Unter Arseniatwirkung wird etwa ebensoviel Milchsäure mehr gebildet als Phosphat mehr abgespalten wird.

Tabelle IX.

Umsatz des *Neuberg*-Esters.

Nr.	Datum 1926	Flüssigkeitsvolumen	Versuchszeit Minuten	Zugesetzter Monoester in mg Zucker	Zusätze	mg Milchsäure	mg P_2O_5 vorher	mg P_2O_5 nachher	Verschwundener Monoester in mg Zucker	Gebildeter Di-Ester in mg Zucker
1a	1. X.	1,0	90	—	—	0,04	0,308	—	—	—
b		1,0	90	4,0	—	0,64	0,362	0	2,20	1,56
c		1,0	5	2,0	—	0,22	0,334	0,17	0,84	0,62
d		1,0	10	2,0	—	0,55	0,334	0,17	1,50	0,95
e		1,0	20	2,0	—	0,625	0,334	0,23	1,53	0,90
f		1,0	90	2,0	—	0,92	0,334	0,55	(1,53)	0,49
g		1,0	90	1,0	—	0,655	0,321	0,612	0,66	—
h		1,0	15	1,0	—	0,456	} 0,334	0,606	1,12	0,24
i		1,2	70	1,0	—	0,45				
2a	5. X.	1,0	45	—	—	0,04	0,37	0,495	—	—
b		1,0	45	3,6	—	0,64	0,42	0	2,34	1,70
c		1,0	45	3,6	0,1 ccm m/15 Phosphat	0,95	0,92	0,635	2,62	1,67
d		1,0	45	3,6	0,1 „ Aktivator	1,21	0,51	0,415	2,68	1,47
3a	12. X.	1,0	60	—	0,05 ccm m/15 Phosphat	0,07	0,655	—	—	—
b		1,0	60	2,8	0,05 „ „ „	1,00	0,655	0,544	2,28	1,28
c		1,0	60	2,0*)	0,05 „ „ „ + 0,12 ccm Aktivator	1,14	0,655	—	—	—
4a	28. X.	—	90	—	0,3 ccm m/15 Phosphat	0,13	2,48	—	—	—
b		3,2	15	6,0	0,3 „ „ „	0,612	2,48	2,40	1,45	0,84
c		3,2	45	6,0	0,3 „ „ „	0,75	2,48	2,60	(1,45)	0,59
d		3,2	90	6,0	0,3 „ „ „	1,13	2,48	2,82	(1,45)	0,30
5a	9. XI.	0,85	80	—	0,05 ccm m/15 Phosphat	0,03	0,582	—	—	—
b		0,85	20	1,8	0,05 „ „ „	0,52	0,582	0,405	1,49	0,97
c		0,85	40	1,8	0,05 „ „ „	0,63	0,582	0,516	1,43	0,80
d		0,85	80	1,8	0,05 „ „ „	0,83	0,582	0,635	1,52	0,55
e		0,85	80	1,8	0,05 „ „ „ + 6 × 10^{-4} m Arseniat	1,10	0,582	1,01	1,10	0

*) Glucose.

2. Arseniatwirkung.

Daß tatsächlich beim Verschwinden anorganischen Phosphats *Harden-Young*scher Ester gebildet wird, ergibt sich nicht nur aus der Wiederaufspaltung in äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure (s. unten S. 147), sondern auch aus dem Einfluß des Natriumarseniats. Denn dieses erhöht außerordentlich die Umsatzgeschwindigkeit in der zweiten Phase, die durch die Wiederaufspaltung des Di-Esters bedingt ist, wobei seine Anhäufung in Wegfall kommt. Dies ist in der oberen Kurve Abb. 10, sowie in dem Versuch 5e, Tabelle IX zu sehen. In diesen Fällen entspricht die gebildete Milchsäure dem zersetzten Monoester genau. Nach allen bisherigen Kenntnissen wirkt aber das Arseniat ausschließlich auf die *Harden-Young*sche Säure. Daß hier die Steigerung der Milchsäurebildung in der zweiten Phase auf eine Wiederaufspaltung des Di-Esters zurückzuführen ist, ergibt sich, wenn man mit und ohne Arseniat sowohl am Schluß der ersten Periode wie auch am Versuchsende das Phosphat bestimmt, wie es in dem folgenden Versuch 2 und auf Abb. 11 geschehen ist. Als Monoester diente der *Robison*sche.

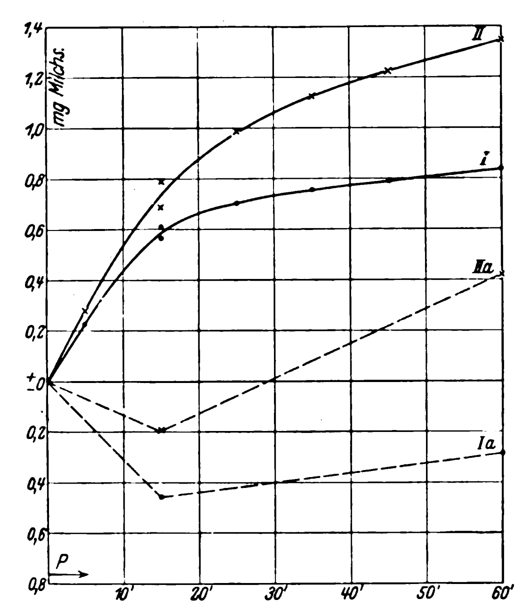


Abb. 11. Umsatz der *Robison*schen Hexosemonophosphorsäure mit und ohne Arseniat. Versuch: 16. XI. 1926. Versuch 2b, c, d, e.
●———●- - - - -● I und Ia: Umsatz ohne Arseniat.
×———×- - - -× II und IIa: Umsatz mit Arseniat.
Auch mit Arseniat findet am Anfang eine geringe Veresterung des Phosphats statt, aber in der zweiten Periode wird gegenüber dem Vergleichsversuch soviel Phosphat mehr abgespalten, als Milchsäure mehr gebildet wird

Versuch 2. 16. November 1926.

Je 0,55 ccm Extrakt; 1 ccm Flüssigkeit mit 0,05 m/15 Phosphat. Nr. a ohne Ester, sonst mit 0,2 ccm m/15 *Robison*-Ester = 2,4 mg Zucker.

Nr.	Versuchszeit Min.	Zusatz	mg Milchsäure	mg P_2O_5		Verschwundener Mono-Ester mg Zucker	Gebildeter Di-Ester in mg Zucker	Differenz gegen Kontrollen	
				vorher	nachher			Mehr gebildete Milchsäure in mg	Phosphatspaltung (in mg Zucker)
a	60	—	0,01	0,602	—	—	—		
b	15	—	0,575	0,602	0,245	2,07	1,50		
c	60	—	0,845	0,602	0,378	2,25	1,40		
d	15	5×10^{-4} m Arseniat	0,69	0,602	0,452	1,76	1,07	+ 0,115	+ 0,265
e	60	5×10^{-4} m Arseniat	1,35	0,602	0,932	1,85	0,50	+ 0,505	+ 0,70

Man sieht aus den beiden letzten Spalten, daß die in der zweiten Versuchshälfte mit Arseniat mehr gebildete Milchsäure aus der Wiederaufspaltung von Hexosediphosphorsäure stammt.

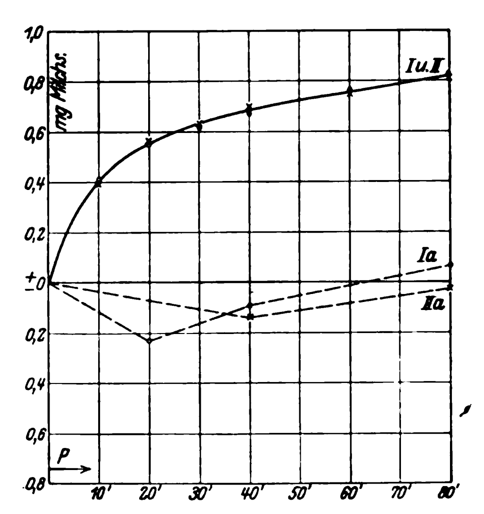


Abb. 12. Vergleich des Umsatzes von *Neuberg*schem und *Robison*schem Ester. Die Kurven der Milchsäurebildung aus dem *Neuberg*schen Ester (⊙——⊙) und dem *Robison*schen (×——×) fallen vollständig zusammen.
○- - - - -○ Ia: Phosphatumsatz aus *Neuberg*schem Ester.
×- - - - -× IIa: Phosphatumsatz aus *Robison*schem Ester.

3. Aufspaltung des Di-Esters bei 37°.

Zum weiteren Beweis, daß das verschwindende Phosphat in Hexosediphosphorsäure übergeht, wurde der Extrakt nach dem Umsatz des

Monoesters auf 37° erwärmt. Wie früher beschrieben, wird so die Spaltung der Hexosediphosphorsäure zunächst wenig beeinflußt, die Veresterung dagegen rasch unterbrochen und ebenso, wie aus den späteren Versuchen folgt, auch die Umlagerung des Monoesters. Während also durch Erwärmung auf 37° der rasche Umsatz des Monoesters sistiert, muß der angehäufte Di-Ester aufgespalten werden. Ganz rein ließen sich diese Versuche nicht durchführen, weil der Monoester bei höherer Temperatur allmählich hydrolytisch gespalten werden kann, ähnlich wie die *Harden-Young*sche Säure, und weil auch die Aufspaltung der Hexosediphosphorsäure mit der Zeit bei 37° zum Stillstand kommt. Jedoch ergibt sich im ganzen, daß in 2 Stunden bei 37° ein erheblicher Zerfall in etwa äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure statthat, der also auf Hexosediphosphorsäure zu beziehen ist. Die Milchsäure wurde in dieser Versuchsreihe chemisch bestimmt. In den fett gedruckten Spalten der Tabelle X ist die bei 37° hinzu-

Tabelle X.

Nr.	Datum 1926	Flüssigkeits-volumen	Zugesetzter Mono-Ester in mg Zucker *)	Zeit **) ab Versuchs-beginn	Temperatur °C	Milchsäure in mg vorher	Milchsäure in mg bei 20° gebildet	Milchsäure in mg bei 37°	mg P_2O_5 vorher	mg P_2O_5 Änderung bei 20°	mg P_2O_5 Änderung bei 37°
1	2. XI.	3,15	4,5 *N.*	0	20	1,11			2,32		
				→45′	20/37	4,10	2,99		3,17	+ 0,85	
				2h45′	37	5,07		**0,97** (0,90 max.)	4,43		**+ 1,26**
2	8. XI.	3,2	10,9 *R.*	0	20	0,27			2,04		
				→60′	20/37	1,91	1,64		0,844	— 1,20	
				3h	37	2,86		**0,95** (4,6 max.)	1,605		**+ 0,76**
3	10. XI.	3,2	7,2 *N.*	0	20	0,49			1,84		
				→50′	20/37	2,46	1,97		1,21	— 0,63	
				2h50′	37	4,92		**2,46** (3,6 max.)	2,80		**+ 1,59**
4	10. XI.	3,2	7,2 *R.*	0	20	0,49			1,84		
				→50′	20/37	2,42	1,93		1,49	— 0,35	
				2h50′	37	3,77		**1,84** (2,8 max.)	2,78		**+ 1,39**

*) *N.* = *Neuberg*. *R.* = *Robison*. — **) → : Von 20 auf 37° gebracht.

gebildete Milchsäure sowie das abgespaltene Phosphat in Milligrammen P_2O_5 angegeben, wobei unter den Milchsäurewerten in Klammern diejenigen Mengen bezeichnet sind, die bei totalem Zerfall der berechneten angehäuften Hexosediphosphorsäure zu erwarten gewesen wären. Die wirklich gebildete Menge bleibt mehr oder weniger dahinter zurück, aber nur in Versuch 2 sehr beträchtlich. Ferner ergibt der Vergleich der fett gedruckten Spalten, daß die gebildete Milchsäure annähernd äquimolekular dem abgespaltenen Phosphat ist. Da 90 mg Milchsäure 71 mg P_2O_5 entsprechen, sind die P_2O_5-Werte mit 1,27 zu multiplizieren. Es ergibt sich dann für das Verhältnis in Versuch 1: $\frac{0,97}{1,60}$, in Versuch 2: $\frac{0,95}{0,97}$ in Versuch 3: $\frac{2,46}{2,02}$, in Versuch 4: $\frac{1,84}{1,76}$.

4. Einfluß von Erwärmung und Entfernung des Coferments auf den Monoesterumsatz.

Hinsichtlich der Beeinflußbarkeit des Extrakts verhält sich die Spaltung der Monoester wie die des Glykogens. Bei kurzem Erwärmen des Extrakts auf 37° wird der rasche Umsatz und die Veresterung aufgehoben, und es bleibt nur noch ein langsamer Zerfall in Phosphat und Milchsäure übrig. Dasselbe geschieht nach Entfernung des Coferments. Wenn auch vielleicht die Spaltung der Hexosediphosphorsäure selbst eine vollkommene Abwesenheit dialysabler und kochbeständiger Anteile des Fermentkomplexes nicht verträgt, so bedarf sie jedenfalls nur einer geringen Menge. Die Spaltung der Monoester ist dagegen auf den gleichen Cofermentgehalt angewiesen wie die des Glykogens. Als Beispiele für den Einfluß der Erwärmung und der Befreiung von Coferment mögen die folgenden beiden Versuche dienen:

Versuch 3.

5. Oktober 1926.

Muskelextrakt 10 Minuten auf 38° erwärmt. In 2 Stunden bei 20° bilden 0,6 ccm Extrakt auf 1 ccm Flüssigkeit

	mg Milchsäure
a) Mit 0,4% Stärke	0,03
b) „ $2,6 \times 10^{-2}$ m Hexosediphosphat	0,21
c) „ $2,0 \times 10^{-2}$ m *Neuberg*-Ester	0,12

Versuch 4. 12. Oktober 1926.

Muskulatur dreimal mit größeren Mengen KCl-Lösung extrahiert, der vierte Extrakt cofermentfrei. Je 0,5 ccm mit und ohne Zusatz von 0,3 ccm Kochsaft, Gesamtvolumen 1,0 ccm.

	mg Milchsäure
a) Ohne Zusatz	0,01
b) Mit 0,3 ccm Kochsaft	0,11
c) „ 1×10^{-2} m Hexosediphosphat	0,40
d) „ 1×10^{-2} m „ + 0,3 ccm Kochsaft	0,52
e) „ $1{,}1 \times 10^{-2}$ m *Neuberg*-Ester	0,05
f) „ $1{,}1 \times 10^{-2}$ m „ + 0,3 ccm Kochsaft	0,58

5. Einfluß des Fluorids.

In den beiden vorhergehenden Arbeiten dieser Serie hatte sich ergeben, daß die von *Embden* entdeckte Anhäufung von Hexosediphosphorsäure unter dem Einfluß des Fluorids auf nichts anderem beruht als einer Hemmung der Wiederaufspaltung des intermediären Esters, der sich infolgedessen in größerem Umfange in die Stabilisierungsform umlagert. Die Synthesegeschwindigkeit bleibt dabei im wesentlichen unbeeinflußt und wird höchstens sekundär dadurch erhöht, daß ein gesteigerter Gehalt von Hexosediphosphorsäure konservierend auf das Fermentsystem wirkt. Genau diesen Mechanismus finden wir bei der Beeinflussung der Monoesterspaltung durch Fluorid wieder: Die Spaltung in Milchsäure unterbleibt, aber die Umlagerung in Hexosediphosphorsäure geht fast ungeschwächt weiter. Da aber infolge des Wegfalls der Milchsäurebildung die Konzentration des Monoesters höher bleibt als in der fluoridfreien Kontrolle, so muß hier die Hexosediphosphorsäure mit der Zeit stärker zunehmen, zumal ja auch ihre eigene Wiederaufspaltung gehemmt wird. Es ergibt sich dann also, ebenso wie beim Glykogenumsatz, mit der Zeit eine stärkere Anreicherung von Hexosediphosphorsäure unter dem Einfluß des Fluorids (Tabelle XII, Nr. 3 und 4).

Zwei Umstände sind besonders bemerkenswert: 1. daß mit höherer Fluoridkonzentration bei total gehemmter Milchsäurebildung die Synthese von Monoester und Phosphat in Di-Ester ohne die Triebkraft irgend einer fremden Reaktion fortschreiten kann; 2. daß hier die Veresterung des anorganischen Phosphats etwa ebenso rasch verläuft als bei gleichzeitiger Milchsäurebildung (Tabelle XII, Nr. 1 und 2). Bezüglich des Punktes 1 ergeben Wärmemessungen der Reaktion, über die in kurzem gemeinsam mit *J. Suranyi* berichtet werden wird, daß die Veresterungsreaktion unter den Versuchsbedingungen eine erhebliche

positive Wärmetönung hat und daher der freiwillige Verlauf der Synthese nicht Wunder nimmt. Punkt 2 aber scheint darauf hinzuweisen, daß die Geschwindigkeit der gekoppelten Zerfalls-Veresterungsreaktion durch die letztere bestimmt wird. Da, wie oben erwähnt, in Gegenwart von Fluorid die manometrischen Versuche nicht sehr zuverlässig sind, so wurde die Milchsäure in der Mehrzahl der folgenden Versuche chemisch bestimmt.

Bei der Veresterung nimmt die H˙-Konzentration zu. Das ist in den folgenden beiden Versuchsbeispielen gezeigt.

Tabelle XI.

Änderung der Wasserstoffzahl bei der Synthese von Hexosediphosphorsäure und gehemmter Milchsäurebildung. Mengen auf 1 ccm berechnet.

Nr.	Mol. Konzentration Mono-Ester	Mol. Konzentration NaF	Versuchszeit	Milchsäure vorhanden mg	Milchsäure gebildet mg	P_2O_5 vorher mg	P_2O_5 Änderung mg	p_H gemessen	p_H Änderung
1	$1,6 \times 10^{-2}$	9×10^{-2}	0	0,23	—	0,753	—	7,11	—
			1h10′	—	—	0,373	− 0,38	6,75	− 0,36
			4h	0,26	0,03	0,276	− 0,48	6,70	− 0,41
2	2×10^{-2}	1×10^{-1}	0	0,114	—	0,745	—	7,29	—
			2h	0,13	0,02	0,36	− 0,38	6,86	− 0,43

Nach der obigen Näherungsrechnung wäre in beiden Versuchen ein Δp_H von etwa − 0,28 zu erwarten, während etwa − 0,4 gemessen wird.

Das Verhalten der Milchsäurebildung und des Phosphatumsatzes in verschiedenen Zeiten mit Fluorid ergibt die Übersicht der Tabelle XII.

Tabelle XII.

Monoesterspaltung in Gegenwart von Fluorid.

Nr.	Datum 1926	Flüssigkeitsvolumen	Mono-Ester in mg Zucker	Versuchszeit	Mol. NaF	mg Milchsäure gebildet	P_2O_5 vorher	P_2O_5 nachher	Anorgan. P_2O_5 verestert	Verschwundener Monoester in mg Zucker
1a	1. X.	3,0	9,2	20′	—	1,43	1,24	0,02	**1,22**	**6,5**
b			9,2		5×10^{-2}	0,0	1,24	0,10	**1,14**	**2,9**
2a	9. X.	3,2	7,5	15′	—	2,4	1,62	0,68	**0,94**	**7,2**
b			7,5		2×10^{-2}	0,16		0,72	**0,90**	**2,1**
3a	12. X.	1,0	2,8	1h	—	1,0	0,655	0,544	**0,11**	**2,28**
b			2,8		$1,2 \times 10^{-1}$	0,25		0,080	**0,575**	**2,0**
4a	20. XII.	1,0	3,6	1h	—	0,43	0,519	0,398	**0,121**	**1,17**
b			3,6		1×10^{-1}	0,28		0,283	**0,236**	**1,17**

Aus den Versuchen folgt, daß in kurzen Zeiten der Schwund des anorganischen Phosphats mit und ohne Fluorid ungefähr gleich ist, so daß der Gesamtumsatz des Monoesters in Gegenwart von Fluorid wegen des Wegfalls der Milchsäurebildung und der ihr entsprechenden Monoesterumlagerung erheblich geringer ist; in längeren Zeiten gleicht sich jedoch die Differenz aus, da jetzt mit Fluorid die Veresterung weiter fortschreiten kann, während sie ohne Zusatz wieder zurückgeht. Der Umstand, daß in der ersten Periode für die in Wegfall gekommene Milchsäurebildung keine vermehrte Anreicherung an Di-Ester statthat, sondern erst späterhin, wenn die Monoesterkonzentration mit Fluorid höher geblieben ist, spricht sehr dafür, daß der Monoester nicht selbst auf dem Wege über einen labilen Di-Ester zerfällt, sondern direkt, und daß das Fluorid spezifisch diesen Monoesterzerfall hemmt, ohne die Umlagerung in den Di-Ester zu verhindern.

6. Vergleich der Neubergschen und Robisonschen Säure.

Schon in den vorigen Abschnitten sind eine Reihe von Versuchen mit *Robison*scher Säure mitgeteilt, die eine weitgehende Übereinstimmung mit der *Neuberg*schen Säure ergeben. Nur ist meist die Veresterung des anorganischen Phosphats etwas geringer und die Umsatzgeschwindigkeit oft ein wenig kleiner. In obiger Abb. 12 ist ein solcher Vergleich gegeben. Diese Versuche sind auch in der Tabelle XIII aufgeführt. Man sieht, daß die *Robison*sche Säure in 40 bis 60 Minuten annähernd total umgesetzt ist.

Tabelle XIII.

Vergleich von *Neuberg*- und *Robison*-Ester.

Nr.	Datum 1926	Flüssigkeitsvolumen	Monoester in mg Zucker*)	Versuchszeit	mg Milchsäure gebildet	P_2O_5 vorher	P_2O_5 nachher	Verschwundener Mono-Ester berechnet in mg Zucker	Gebildet. Di-Ester in mg Zucker
1a	9. XI.	0,85	1,8 *N.*	40′	0,63	0,582	0,516	1,43	0,80
b			1,8 *N.*	80	0,83		0,635	1,52	0,55
c			2,4 *R.*	40	0,70		0,478	1,66	0,96
d			2,4 *R.*	80	0,81		0,560	1,68	0,87
2a	24. XI.	2,2	9,6 *N.*	45	2,00	1,825	1,02	6,06	4,06
b			6,4 *R.*	45	1,84		1,17	5,45	3,61
c			6,4 *R.*	90	2,10		1,43	(5,45)	3,28
3a	26. XI.	2,05	6,5 *N.*	60	1,87	1,645	0,745	6,05	4,2
b			5,6 *R.*	60	1,82		0,996	5,30	3,5

*) *N.*: *Neuberg*, *R.*: *Robison*.

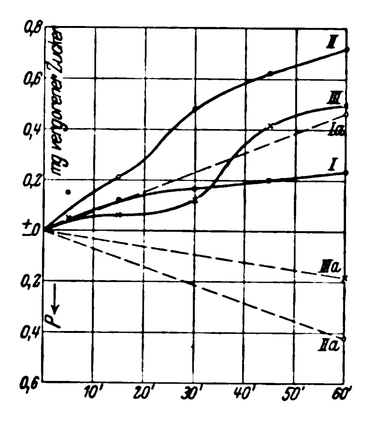


Abb. 13.
Vergärung der *Harden-Young*schen Säure und der Monoester im Hefemazerationssaft.
Versuch: 1. XI. 1926. Tabelle XV, 3a, b, c.

●——●	Kurve	I:	*Harden-Young*scher Ester.
○——○	„	II:	*Neuberg*scher Ester.
×——×	„	III:	*Robison*scher Ester.
●----●	„	Ia:	Entsprechender Phosphatumsatz in 60 Minuten.
○----○	„	IIa:	„ „ „ 60 „
×----×	„	IIIa:	„ „ „ 60 „

Bei der *Harden-Young*schen Säure wird hier mehr Phosphat abgespalten als Gärungskohlensäure entsteht. Die Gärung findet mit konstanter Geschwindigkeit statt, die anfängliche Erhöhung der Geschwindigkeit ist nur scheinbar und durch die Druckänderung beim Einkippen des Esters vorgetäuscht. Der *Neuberg*sche Ester zeigt zwischen 15 und 30 Minuten, der *Robison*sche zwischen 30 und 45 Minuten einen ausgesprochenen Gäranstieg.

Auch hier entspricht die Zunahme der Milchsäure in der zweiten Umsatzperiode etwa der wieder aufgespaltenen Hexosediphosphorsäure (Versuch 1 und 2).

D. *Synthetische Monoester.*

Wie bereits erwähnt, werden die synthetischen Monoester im Gegensatz zu den natürlichen im Muskelextrakt nur äußerst schwach angegriffen; bei der Spaltung wird im allgemeinen kein anorganisches Phosphat verestert, vielmehr öfters hydrolytisch abgespalten. Ein ungefähres Bild der Reaktionsgeschwindigkeit erhält man, wenn bei etwa einstündigen Versuchen im gleichen Extrakt der Umsatz der *Neuberg*schen Säure = 100 gesetzt wird und der Kontrollwert ohne Kohlehydratzusatz abgezogen wird. In der Tabelle XIV sind mehrere solcher Versuche angeführt, aus denen sich ergibt, daß die Umsatzgeschwindigkeit der synthetischen Ester nur wenige Prozent der des *Neuberg*schen Esters ausmacht.

Tabelle XIV. Umsatz der synthetischen Phosphorsäureester.

Nr.	Datum 1926 u. 1927	Flüssigkeitsvolumen	Benutzter Ester	Estermenge in mg Zucker	Versuchszeit	mg Milchsäure	P_2O_5 vorher	P_2O_5 nachher	Milchsäurebildung in % der *Neuberg*-S.
1a	20. XII.	1,0	—	—	60′	0,03			
b			Saccharosemonophosphorsäure	3,6		0,04			3
c			*Neuberg*-Säure	3,6		0,43			100
2a	12. I.	1,0	—	—	45′	0,015	0,70	0,77	—
b			*Hatano*scheSäure (Säurehydrolyse)	3,6		0,170		0,72	16
c			ebenso	1,5		0,044			
d			*Neuberg*-Säure	3,6		0,93		0,275	100
3a	4. II.	1,0	—	—	1h40′	0,03	0,668	0,731	
b			*Hatano*(Invertinspaltung)	3,6		0,05		0,76	3
c			*Nodzu*sche Fructosephosph.	3,6		0,08		0,80	6
d			*Nodzu*sche Glucosephosph.	3,6		0,04		0,502	2
e			*Neuberg*-Säure	3,6		0,80		0,195	100
4a	10. III.	1,0	—	—	40′	0,03			
b			*Nodzu* 3(4)-Glucosephosph.	3,6		0,02			0
c			*Neuberg*-Säure	3,6		0,80			100

III. Die Vergärung der Hexosemonophosphorsäuren durch Hefemazerationssaft.

A. Natürliche Monoester.

Wie schon in der vorläufigen Mitteilung hervorgehoben, erstreckt sich der Parallelismus zwischen dem Kohlehydratumsatz im Muskel- und Hefeextrakt auch auf das Verhalten der Hexosemonophosphorsäuren. Ebenso wie im Muskelextrakt werden auch bei der Gärung im Hefeextrakt die natürlichen Monoester mit einer erhöhten Anfangsgeschwindigkeit umgesetzt, wobei ein Teil in Alkohol und Kohlensäure zerfällt, während ein anderer unter Aufnahme von Phosphat in Di-Ester übergeht. Bei kleinen Esterkonzentrationen fällt auch hier die Geschwindigkeit erst ab, wenn die Umlagerung annähernd vollständig ist. Bei höheren Konzentrationen über m/50 verlangsamt sich allerdings der Umsatz schon vor der totalen Umlagerung. Diese beschleunigte Vergärung mit Umlagerung fehlt bei allen synthetischen Estern. Daß diese trotzdem langsam vergoren werden können, ist verständlich, da ja der durch Hydrolyse frei gesetzte Zucker, der im Muskelextrakt ohne Hefeaktivatorzusatz beständig ist, im Hefesaft leicht vergoren wird. So wird auch die Saccharosemonophosphorsäure vergoren, indem die Fructosekomponente durch Invertin abgespalten wird. Aus diesem

Grunde verwischen sich die starken Unterschiede, die zwischen der Umsatzgeschwindigkeit der natürlichen und synthetischen Ester in der Anfangszeit von etwa 30 Minuten bis 1 Stunde bestehen (bei 28°) in längeren Zeiträumen. In einer kürzlich erschienenen Arbeit von *Neuberg* und *Kobel*[1]) erscheinen daher die Unterschiede zwischen den natürlichen und synthetischen Monoestern etwas geringer als hier, zumal die Konzentrationen der Autoren höher als unsere liegen.

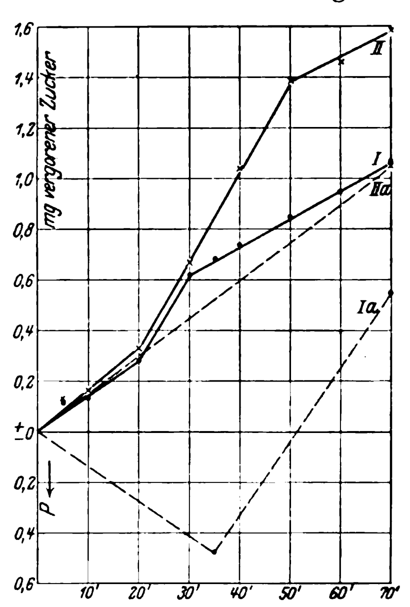


Abb. 14. Vergärung des *Robison*schen Esters im Mazerationssaft mit und ohne Arseniat. Versuch: 19. XI. 1926. Tabelle XV, 4c, d, e. Annähernder Totalumsatz von 2,4 mg *Robison*schem Ester in 70 Minuten.

●————● I: Ohne Arseniat.

● – – – – – ● Ia: Zugehöriger Phosphatumsatz. Das in der zweiten Periode abgespaltene Phosphat übertrifft die gleichzeitig gebildete Gärungskohlensäure.

×—×– –× II und IIa: Mit 3 . 10^{-3} Arseniat. Die große Gärungsperiode wird verlängert; gleichzeitig wird eine der Mehrbildung von Kohlensäure etwa entsprechende Menge Phosphat mehr abgespalten als ohne Arseniat.

Jedoch reagieren auch die natürlichen Monoester im Hefesaft nicht so rasch wie im Muskelextrakt. Sie zeigen einerseits sowohl die Induktionsperiode und den Gäranstieg wie die Zucker überhaupt, auf der anderen Seite erreicht aber die Vergärung bei ihnen niemals dieselbe Geschwindigkeit wie bei den Hexosen. Die von außen zugesetzten Monoester finden also offenbar im Saft nicht genau jene Bedingungen vor, die bei der Zuckergärung entstehen und den raschen Umsatz der gebildeten Intermediärprodukte bewirken. Daß übrigens auch bei der Gärung der Hexosen der Prozeß auf Zwischenstufen zum

[1]) Diese Zeitschr. **179**, 451, 1926.

Stillstand kommen kann, geht ja aus der Anhäufung der *Robison*schen Säure hervor. Denn diese ist offenbar nichts anderes als ein Teil des Intermediärprodukts, das der gekoppelten Zerfalls-Veresterungsreaktion entgangen ist. Der Verlauf des Umsatzes geht aus den Abb. 13 bis 16

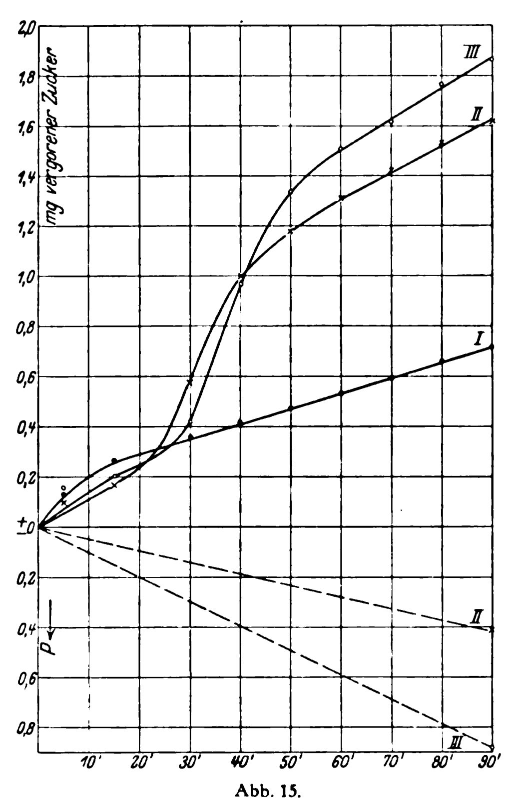


Abb. 15.
Vergleich der Vergärung von *Harden-Young*scher Säure, *Neuberg*scher und *Robison*scher Säure.
Versuch: 29. XI. 1926. Tab. XV, 5b, c, f.
●———● I: *Harden-Young*sche Säure.
× × II: *Neuberg*sche Säure.
○———○ III: *Robison*sche Säure.
Die Monoester sind in 90 Minuten annähernd total umgesetzt. Der Gäranstieg der *Robison*schen Säure erfolgt etwas später als der der *Neuberg*schen. Der Gesamtumsatz ist aber etwas höher. Der Anfangsanstieg bis 10 Minuten ist zum Teil auf die Druckänderung beim Einkippen des Esters zurückzuführen.

hervor. Der Gesamtumsatz sowie die Phosphatbilanz ist in der Tabelle XV wiedergegeben.

Aus der vorletzten Spalte der Tabelle XV ersieht man, daß bei den hier benutzten Mengen nahezu der ganze Monoester in der Versuchszeit umgelagert ist. Aus den Kurven ergibt sich, daß der Hauptumsatz etwa 30 bis 60 Minuten nach Zusatz des Esters sich abspielt. Nachher entspricht die Geschwindigkeit der der Spaltung zugesetzter Hexose-

Tabelle XV.

Vergärung der natürlichen Phosphorsäureester.

Nr.	Datum 1926	Gesamtvolumen	Versuchszeit	Zugesetzter Ester	Enthaltend mg Zucker	Zusätze	Vergorener Zucker in mg (aus CO_2 berechnet)	P_2O_5 vorher	P_2O_5 nachher	Verschwundener Mono-Ester in mg Zucker	Gebildeter Di-Ester in mg Zucker
1a	8. X.	0,8	75′	—	—	—	0,05	3,79	—	—	—
b			55	*Neuberg*	ca. 3,0	—	0,90		3,02	3,70	2,80
c			75	"	3,0	—	1,05		3,41	3,05	2,00
d			75	"	3,0	5×10^{-3} Aldehyd	1,04		3,18	3,65	2,60
e			75	"	3,0	3×10^{-3} Arseniat	2,15		4,79	2,55	0
2a	1. XI.	0,7	60	"	3,0	—	0,56	3,56	3,19	2,06	1,50
b			60	"	3,0	6×10^{-3} Aldehyd	0,70		2,99	2,85	2,15
3a	1. XI.	0,7	60	Hexosediphosphorsäure	1,8	—	0,33	2,85	(3,22)	—	
b			60	*Neuberg*	3,0	—	0,78		2,52	2,40	
c			60	*Robison*	3,0	—	0,54		2,71	1,40	
4a	19. XI.	0,8	70	—	—	—	0,06	5,12			
b			70	Hexosediphosphorsäure	2,2	—	0,79		(6,11)		
c			35	*Robison*	2,4	—	0,62		4,75	2,20	1,58
d			70	"	2,4	—	1,07		5,55	(2,20)	0,48
e			70	"	2,4	3×10^{-3} Arseniat	1,59		5,95	2,12	0
f			70	*Neuberg*	3,2	—	1,20		5,20	2,20	1,00
5a	29. XI.	0,8	90	—	—	—	0,04	6,17	6,19		
b			90	Hexosediphosphorsäure	4,5	—	0,715				
c			90	*Neuberg*	5,5	—	1,62		5,85	4,04	2,42
d			90	"	5,5	1×10^{-3} NaF	0,15		5,81	1,07	0,92
e			90	"	5,5	5×10^{-3} NaF	0,01		6,00	0,44	0,43
f			90	*Robison*	5,5	—	1,87		5,54	5,40	3,53
g			90	"	5,5	1×10^{-3} NaF	0,19		5,76	1,60	1,41

diphosphorsäure (die etwas erhöhte Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung des Magnesiumhexosediphosphats beruht auf Beimengungen von Monophosphorsäure in dem ungereinigten Salz). Während in der ersten Zeit anorganisches Phosphat verschwindet, setzt nachher eine Abspaltung von Phosphat ein, die meistens größer ist als sich für die glatte Vergärung der Hexosediphosphorsäure berechnet; vielleicht kommt es dabei zu zusätzlicher Hydrolyse. Auch hier vergärt der *Neuberg*sche Ester nur wenig rascher als der *Robison*sche. Der Einfluß von Zusätzen: Aldehyd, Arseniat und Fluorid ist genau wie bei der Gärung der Polysaccharide. Aldehyd steigert die Geschwindigkeit der Angärung, ohne den Gesamtumsatz zu erhöhen. Letzteres geschieht dagegen durch Arseniat, und zwar, wie aus den Kurven sowie den Phosphatbilanzen hervorgeht, durch Aufspaltung der Hexosediphosphorsäure. Infolgedessen tritt die Steigerung erst in der zweiten Versuchshälfte in Erscheinung. Die Anhäufung der Hexosediphosphorsäure unterbleibt, und es wird noch etwas mehr Phosphat abgespalten, als der direkten Vergärung des Monoesters entsprechen würde. Von besonderem Interesse ist, daß auch Fluorid hier ebenso wirkt wie bei der Vergärung des Glykogens: Die Vergärung der Monoester wird durch n/1000 NaF nahezu aufgehoben, während die Veresterung des anorganischen Phosphats weiter geht: eine Trennung von Vergärung und Veresterung, wie sie zwar nicht bei den Hexosen, wohl aber beim Glykogen mit Natriumfluorid gelungen war. Schließlich sei erwähnt, daß auch die Vergärung der Monoester im Hefeextrakt auf die Anwesenheit des Coferments angewiesen ist, so daß sie im dialysierten Mazerationssaft direkt nicht eintritt, sondern erst nach Zugabe von Kochsaft, im Gegensatz zu dem Verhalten der Hexosediphosphorsäure[1]). Auch

[1]) *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **183**, 210, 1927. (Zusatz bei der Korrektur:) *Euler* und *Myrbäck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **165**, H. 1/3, 31. März 1927, S. 40 f., 1927 bestätigen in einer soeben veröffentlichten Arbeit den erwähnten Befund nur insofern, als das käufliche hexosediphosphorsaure Salz zu erheblichem Teile cofermentfrei vergären kann — wobei nach ihren Versuchen in 18 Stunden nahezu die Hälfte der maximal möglichen Kohlensäure entsteht —, während bei über das Bariumsalz gereinigter Hexosediphosphorsäure diese Erscheinung verschwand. Die Autoren nehmen deshalb an, daß diese Vergärung nicht auf die Hexosediphosphorsäure, sondern auf die dem käuflichen Salz in großer Menge anhaftenden Verunreinigungen zurückzuführen sei. Uns erscheint es wahrscheinlicher, daß auch in den Versuchen der Stockholmer Autoren die *Harden-Young*sche Säure cofermentfrei vergor, daß aber durch den Reinigungsprozeß als Aktivatoren wirkende Substanzen abgetrennt wurden. Tatsächlich ergab sich in unseren eigenen Versuchen kein Unterschied, ob wir das direkt von Bayers Farbwerken gelieferte Magnesiumhexosephosphat oder über das Pb- und Bariumsalz durch wiederholtes Umfällen gereinigtes Natriumhexosephosphat benutzten. Auf der anderen Seite scheint es möglich, daß bei gänzlicher



in diesen Punkten bewährt sich daher der durchgehende Parallelismus der alkoholischen Gärung und Milchsäurebildung in den zellfreien Extrakten.

B. Synthetische Monoester.

Die synthetischen Monoester zeigen, wie schon erwähnt, im Mazerationssaft nur eine langsame Gärung, die mit Phosphatabspaltung einhergeht. Abgesehen von der Vergärung des durch die Phosphat-

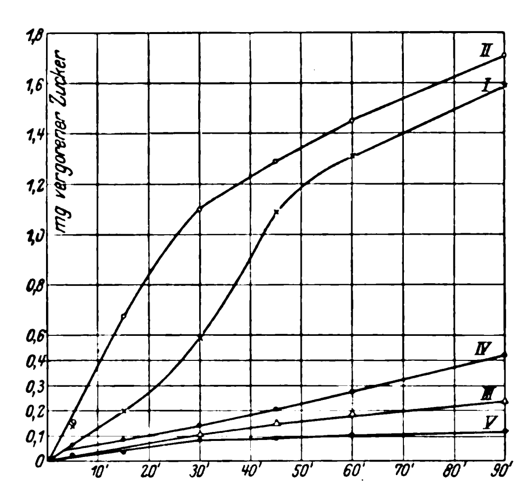


Abb. 16. Umsatz des *Neuberg*schen Esters mit und ohne Aldehyd, sowie synthetischer Monoester. Versuch: 8. II. 1927. Tabelle XVI, 2a, b, c, f, h.

×··········× I: *Neuberg*scher Ester.

○··········○ II: *Neuberg*scher Ester mit Zusatz von $1 \cdot 10^{-2}$ n Acetaldehyd, wobei der Gäranstieg der ersten Periode in Wegfall kommt, so daß die Geschwindigkeit gleich maximal einsetzt.

△———△ III: *Hatano*scher Ester.

◐———◐ IV: *Nodzu*scher Fructose-Ester.

●———● V: ohne Monoesterzusatz (mit $7 \cdot 10^{-4}$ Hexosediphosphat, wie in den anderen Versuchen, um die Induktionsperiode aufzuheben).

hydrolyse frei gesetzten Zuckers kommt bei der Saccharosemonophosphorsäure noch die des durch Invertin abgespaltenen hinzu. Der verschiedene Verlauf gegenüber dem *Neuberg*schen Ester ergibt sich aus der Abb. 16, sowie aus der Tabelle XVI[1]).

Abwesenheit cofermentartiger Substanzen ebenso wie im Muskelextrakt auch im Hefeextrakt die Hexosediphosphorsäure nicht mehr gespalten wird, und da ein Kriterium für die völlige Abwesenheit von Coferment fehlt, dürfte es richtig sein, die bereits anfangs gewählte Ausdrucksweise festzuhalten, daß eine Vergärung der Hexosediphosphorsäure im Gegensatz zur Glucose in „ganz cofermentarmer Lösung“ geschehen kann.

[1]) Für einen längeren Zeitraum (10 Stunden) erhielten *Neuberg* und *Kobel* in der angeführten Arbeit im Mazerationssaft bei 26° aus Fructose und Glucose 66 ccm, *Neuberg*schem Ester 25,8 ccm, *Robison*schem Ester 21,9 ccm, *Hatano*scher Säure 11,5 ccm CO_2.

Tabelle XVI.

Vergärung der synthetischen Monoester.

Nr.	Datum 1927	Gesamtvolumen	Versuchszeit	Zugesetztes Kohlehydrat	Enthaltend mg Zucker	Zusatz	Aus CO_2 berechnete vergorene Zuckermenge mg	P_2O_5 vorher	P_2O_5 nachher	Aus P_2O_5 berechnete Mono-Ester-spaltung (in mg Zucker)
1a	8. II.	0,95	2h10′	Ohne Zusatz	—	—	**0,11**	8,40		
b				Rohrzucker	7,5	—	**8,0**			
c				*Neuberg*-Ester	5,4	—	**1,48**		8,38	0
d				Saccharosemonophosphorsäure	10,0	—	**0,76**		8,41	0
e				*Hatano*-Ester	5,4	—	**0,54**		8,65	0,64
f				*Nodzu*-Glusosephosphorsäure	5,4	—	**0,25**		—	—
g				*Nodzu*-Fructosephosphorsäure	5,4	—	**0,66**		8,78	0,95
2a	8. II.	1,0	1h30′	Ohne Zusatz	—	—	**0,12**			
b				*Neuberg*-Ester	5,4	—	**1,60**			
c				"	5,4	1 × 10^{-2} Aldehyd	**1,71**			
d				Saccharosemonophosphorsäure	10,0	—	**0,48**			
e				"	10,0	1 × 10^{-2} Aldehyd	**0,60**			
f				*Nodzu*-Fructosephosphorsäure	5,4	—	**0,42**			
g				"	5,4	1 × 10^{-2} Aldehyd	**0,60**			
h				*Hatano*-Ester	5,4		**0,46**			
3a	11. III.	0,75	60′	Ohne Zusatz	—	—	**0,06**	8,22	8,20	
b				Rohrzucker	5,4		**8,1**			
c				*Neuberg*-Ester	5,4		**0,92**		7,92	(— 0,82)
d				*Nodzu*-3, (4)-Glucose	5,1		**0,10**		8,17	0

C. Umsatz der Monoester durch lebende Hefe.

Anhangsweise sei kurz das Verhalten lebender Hefe gegenüber den Zuckerphosphorsäureestern betrachtet. Es ist bereits bekannt, daß die Hexosediphosphorsäure von lebender Hefe praktisch nicht vergoren wird. Bezüglich der Monoester fanden *Neuberg* und Mitarbeiter[1]), daß sie in längeren Zeiträumen vergoren werden können, aber offenbar nach vorangegangener hydrolytischer Abspaltung des Zuckers; ähnliches gibt *Nodzu* für seine synthetischen Ester an. In der Tat läßt sich in kurzen Zeiträumen weder bei den natürlichen noch synthetischen Estern eine im Vergleich zum freien Zucker in Betracht kommende Vergärung durch lebende Hefe feststellen. Anders ist die Wirkung der Ester auf die Atmung. Zunächst zeigt ungereinigtes Magnesiumhexosediphosphat eine starke Steigerung der Atmung von Bäckerhefe auf etwa den fünffachen Betrag, nicht viel geringer als die Steigerung durch Hexosen[2]). Dies ist jedoch auf Beimengungen von Monoester, der in älteren Präparaten durch Abspaltung entsteht, zurückzuführen. Reinigt man die Hexosediphosphorsäure über das Blei- und Bariumsalz, so wirkt sie nicht mehr auf die Atmung ein. Wohl aber geschieht dies auch durch die reinsten von uns hergestellten Präparate der Monoester. In höheren Konzentrationen des *Robison*schen und *Neuberg*schen Esters ist die Atmungssteigerung ebenso groß wie in Gegenwart von Traubenzucker, bei frischer Bäckerhefe und 28° auf etwa das 10- bis 12fache. Gleichwohl besteht gegenüber der Steigerung der Atmung durch Zucker und Gärungsprodukte (Alkohol, Aldehyd, Essigsäure) der Unterschied, daß bei diesen die Wirkung weitgehend unabhängig von der Konzentration ist und etwa so lange anhält, bis die zugesetzte Substanz durch Oxydation und Assimilation völlig verbraucht ist. Die Atmungssteigerung durch die Monoester nimmt dagegen mit wachsender Konzentration stark zu und hält nur so lange an, bis ein für jedes Präparat genau konstanter Bruchteil der zugesetzten Menge veratmet ist. Dann sinkt die Atmung sehr rasch auf den Kontrollwert ab. Während die *Geschwindigkeit* der Atmung in der raschen Periode natürlich proportional der benutzten Zellmenge ist, ist der Gesamtumsatz in dieser Periode von der Zellmenge unabhängig und nur von der Menge des zugesetzten Esters abhängig. Es geht daraus hervor, daß ein bestimmter Teil des Esters herausoxydiert wird, dessen Menge mit dem Präparat wechselt, bei dem *Neuberg*schen Ester etwa 4 bis 7 % der gesamten Zuckermenge, bei dem *Robison*schen etwa 12 %, bei dem *Nodzu*schen Glucose-3-(4)-phosphorsäureester 6 %

---

[1]) *Hatano*, diese Zeitschr. **159**, 175, 1925; *Neuberg* und *Sabetay*, ebendaselbst **162**, 479, 1925; *Neuberg* und *Kobel*, ebendaselbst **179**, 451, 1926.

[2]) *O. Meyerhof*, ebendaselbst **162**, 43, 1925.

betrug. Hierbei bildet sich Kohlensäure mit dem respiratorischen Quotienten von etwa 0,8. Gleichzeitig wird viel weniger Phosphat abgespalten, als der Zerfall von Monoester erwarten läßt, ebensowenig wird Phosphat von der Hefe aufgenommen, wie sich durch Veraschung der Hefe nach *Neumann* feststellen ließ. Offenbar sind die Ester in dem angegebenen Betrage mit einer veratembaren zuckerähnlichen Substanz verunreinigt; doch kann es sich hierbei nicht um eine vergärbare Hexose handeln, da ja dieselben Hefen in Gegenwart der gleichen Estermenge keine Vergärung zeigen. Eine Veratmung des Esters selbst findet aber jedenfalls nicht statt. Es besteht auch kein Unterschied zwischen natürlichen und synthetischen Estern.

IV. Diskussion.

Das ganze Verhalten der natürlichen Monoester spricht dafür, daß eine ihnen entsprechende Verbindung als Intermediärprodukt der Zuckerspaltung im Muskelextrakt und im Hefesaft auftritt, und daß der Zerfall dieses Esters der geschwindigkeitsbestimmende Faktor während der „Phosphatperiode" ist. Damit soll nicht gesagt sein, daß der fragliche Monoester mit der *Neuberg*schen oder *Robison*schen Säure genau identisch ist. Beides sind möglicherweise isomere Gemische von Fructose- und Glucosemonophosphorsäure in verschiedenem Verhältnis. Es wäre z. B. gut denkbar, daß primär lediglich Fructosemonophosphorsäure entstünde, und daß das Überwiegen der Glucosekomponente in der *Robison*schen Säure darauf zurückzuführen ist, daß diese eine geringere Reaktionsfähigkeit hat und dadurch allmählich aus dem Umsatz ausgeschaltet wird. Es ist ferner möglich, daß diese isolierbaren Monoester selbst schon eine Art Stabilisierungsprodukt des Monoesters im status nascens darstellen, oder daß beim Übergang des Monoesters in den Di-Ester ein labiles Produkt entsteht, wobei ein Teil rasch zerfällt, während der Rest sich mit Phosphorsäure zur *Harden-Young*schen Säure stabilisiert[1]). Daß jedoch der Monoester nicht erst auf dem Wege über einen Di-Ester zerfällt, scheint aus den Fluoridversuchen des Kapitels II hervorzugehen. Das Verhalten der Monoester im Muskel- und Hefeextrakt erklärt bis zu einem gewissen Grade die Zuckerspaltung darin, die mit der Bildung der *Harden-Young*schen Säure verknüpft ist. Die genau hälftige Teilung der Zuckermoleküle jedoch in zerfallende und veresternde, wie sie in der ersten *Harden-Young*schen Gärungsgleichung zum Ausdruck kommt, wird dadurch noch nicht

[1]) Ob das von *Embden* neuerdings als Hexosemonophosphorsäure erkannte „Lactacidogen" oder etwa auch das „Phosphagen" *Eggletons* den hier postulierten labilen Phosphorsäureester des Muskelextrakts darstellt, wird in einer folgenden Arbeit untersucht.



ursächlich aufgeklärt. Diese genau hälftige Teilung findet sich nur, wie in der vorigen Arbeit beschrieben ist, beim Umsatz der Hexosen, nicht bei dem der Polysaccharide. Sie würde durch die Bildung eines Monoesters als Zwischenprodukt erklärt, wenn dieser mit einem zweiten Monophosphatmolekül derart reagierte, daß ein Zuckerrest aufgespalten wird, während das hierbei frei kommende Phosphat an das zweite Monoestermolekül angelagert wird. Wenn es auch möglich scheint, daß solch abgespaltenes Phosphat leichter reagiert als das in der Lösung vorhandene, zeigt doch der Umsatz zugesetzter Monoester keinen ausgeprägten derartigen Unterschied, und nur unter mehr zufälligen Bedingungen der Konzentration des Phosphats und Esters bleibt in manchen Fällen die Phosphatkonzentration während des Umsatzes des Monoesters nahezu konstant, d. h. es reagiert nur das abgespaltene Phosphat. Außer diesem raschen Zerfall, der nur gekoppelt mit der Synthese des Di-Esters vor sich geht, gibt es noch eine langsame Aufspaltung der Monophosphorsäure direkt in Phosphorsäure und Milchsäure im Muskelextrakt. Diese direkte Aufspaltung, die vor allem in schlechter wirksamen Extrakten erkennbar ist, liegt wahrscheinlich dem Zerfall der Hexosediphosphorsäure zugrunde, wo ja die Abspaltung der Phosphorsäure auch über einen intermediären Monoester führen dürfte. Die Annahme liegt nahe, daß im lebenden Muskel und in der lebenden Hefe die Anhäufung der Hexosediphosphorsäure als Stabilisierungsprodukt überhaupt unterbleibt, indem durch Eingriff der Struktur diese so rasch wieder aufgespalten wird, wie sie entsteht. So würde es erklärlich, daß bei der Kohlehydratspaltung im intakten Muskel und in der unbeschädigten lebenden Hefe keine Hexosediphosphorsäure nachweisbar ist, sondern erst in Zellbreien, Trockenpräparaten, Extrakten, nach Toluolzusatz usw. Andererseits aber beweist die Spaltung der *Harden-Young*schen Säure in solchen Zellpräparaten, daß dieser Vorgang ein integrierender Bestandteil des Zerfallsmechanismus in der lebenden Zelle sein muß.

Auf welcher konstitutionellen Verschiedenheit der ausgeprägte Unterschied zwischen den natürlichen und synthetischen Monoestern beruht, muß dahingestellt bleiben; doch ist der Parallelismus, der zwischen der relativen Stärke der Kupferreduktion, der Oxydierbarkeit in Phosphatlösung und dem Umsatz im Muskel- und Hefeextrakt besteht, bemerkenswert.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit werden die natürlichen und synthetischen Hexosemonophosphorsäuren in ihrem chemischen Verhalten, sowie bezüglich ihres Umsatzes im Muskelextrakt und vergleichsweise auch im Hefemazerationssaft studiert.

1. In chemischer Beziehung unterscheiden sich die natürlichen Ester, der *Robison*sche und der aus *Harden-Young*scher Säure erhaltene *Neuberg*sche Ester von den synthetischen (Glucosemonophosphorsäure nach *Neuberg* und *Sabetay* und *Hatano*, Fructose- und Glucosemonophosphorsäuren von *Nodzu*) durch ihren erheblich stärkeren Reduktionswert nach *Bertrand*, unter sich durch ihren verschiedenen Aldosegehalt nach *Willstätter*. Sie sind ferner im Gegensatz zu den synthetischen Estern und zur Hexosediphosphorsäure zu rascher Spontanoxydation in Phosphatlösung befähigt, wobei entsprechend dem höheren Ketosengehalt der *Neuberg*sche Ester drei- bis viermal rascher als der *Robison*sche und gut doppelt so stark als Fructose oxydiert wird.

Die Monoester sind noch stärkere Säuren als die Hexosediphosphorsäure, und zwar ergeben sich für die *Neuberg*sche und *Robison*sche Säure nahezu übereinstimmend pK'_1 0,97 und 0,94, pK'_2 6,11; für die Glucosemonophosphorsäure von *Hatano* pK'_1 0,61, pK'_2 5,83; Nodzu-3-(4-)glucosemonophosphorsäure pK'_1 0,84, pK'_2 5,67.

2. Die natürlichen Monoester werden im Muskelextrakt anfänglich mit großer Geschwindigkeit umgesetzt, wobei ein Teil in Milchsäure zerfällt, ein anderer gleichzeitig zu Hexosediphosphorsäure synthetisiert wird. Die Geschwindigkeit sinkt auf die Spaltungsgeschwindigkeit der Hexosediphosphorsäure oder noch stärker ab, wenn entweder der Monoester durch Synthese und Spaltung total aufgebraucht ist oder das anorganische Phosphat der Lösung gänzlich verestert ist, gelegentlich aber auch schon früher aus unbekannten Ursachen. Die Anhäufung von *Harden-Young*scher Säure bei dem Umsatz ergibt sich aus ihrer raschen Wiederaufspaltung in Gegenwart von Arseniat, wo eine dem wieder abgespaltenen Phosphat ungefähr äquimolekulare Milchsäuremenge mehr als im Vergleichsversuch gebildet wird. Ferner wird auch bei 37° der angehäufte Ester in annähernd gleiche Mengen Milchsäure und Phosphorsäure aufgespalten. In Gegenwart von Fluorid unterbleibt die Spaltung in Milchsäure, während die Synthese zum Di-Ester unter Aufnahme des anorganischen Phosphats weitergeht ohne die Triebkraft irgend einer anderen Reaktion. Die Zerfalls-Veresterungsreaktion verläuft nur in Gegenwart von Coferment und verhält sich in ihrer Empfindlichkeit wie die Spaltung der Polysaccharide. Im Gegensatz zum *Robison*schen und *Neuberg*schen Ester, die unter sich nur geringfügige Unterschiede zeigen, sind die synthetischen Ester im Muskelextrakt fast stabil entsprechend ihrem geringen Reduktionswert und ihrer Beständigkeit in Phosphatlösung.

3. Genau der gleiche Mechanismus läßt sich auch bei der Vergärung der natürlichen Monoester im Hefeextrakt nachweisen; auch hier wird in der ersten Periode der Ester rasch umgesetzt, wobei er zum



Teil vergärt, zum anderen sich in Hexosediphosphorsäure umlagert, während in der zweiten Periode diese aufgespalten wird. Arseniat und Fluorid wirken ähnlich wie im Muskelextrakt. Die Gärung zeigt zum Unterschied von der der Hexosediphosphorsäure eine Induktionsperiode und einen Gäranstieg wie die Gärung der Hexosen. Der Umsatz ist jedoch öfters weniger vollständig als im Muskelextrakt. Die synthetischen Ester werden auch hier viel langsamer angegriffen und scheinen nur nach vorangegangener Hydrolyse vergärbar.

Vieles spricht dafür, daß der für die Kohlehydratspaltung im Muskel- und Hefeextrakt postulierte „intermediäre Ester im status nascens" eine Hexosemonophosphorsäure ist, die nach Art des *Robison*schen und *Neuberg*schen Esters reagiert.

Über die Bildung von Sauerstoff aus Kohlendioxyd durch Eiweiß-Chlorophyllösungen.

Von

H. E. Dolk und A. G. van Veen.

(Aus dem botanischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

(Eingegangen am 25. März 1927.)

Vor einigen Jahren haben *Eisler* und *Portheim*[1]) Untersuchungen über dieses Thema veröffentlicht, die unsere Aufmerksamkeit in hohem Maße auf sich lenkten. Die beiden Forscher behaupten nämlich, daß es ihnen gelungen sei, Chlorophyll-Eiweißlösungen herzustellen, die, dem Sonnenlicht ausgesetzt, aus CO_2 O_2 zu bilden vermöchten.

Es schien uns von großer Wichtigkeit, diese Versuche zu wiederholen, weil aus ihnen hervorgeht, daß die Kohlensäurereduktion nicht nur unabhängig ist vom lebenden Protoplasma[2]), sondern auch, entgegen der herrschenden Auffassung, enzymatische Reaktionen dazu nicht notwendig sind.

Nach *Eisler* und *Portheim* sollte der Dispersitätsgrad eine wesentliche Rolle spielen und die Lösungen des Chlorophyll-Eiweißes photodynamische Wirkungen zeigen. Natürlich wäre der Assimilationsprozeß an solchen Eiweiß-Chlorophyllösungen leichter zu studieren als am lebenden Blatt.

Eisler und *Portheim* benutzen einen Differentialblutgasapparat nach *Haldane*, da sie die „Leuchtbakterienmethode“ von *Molisch* für nicht geeignet hielten. Später zeigte allerdings *Molisch* (in der oben zitierten Abhandlung), daß dieses Verfahren im Gegenteil sehr geeignet ist; infolgedessen haben wir auch diese Methode angewendet.

Eine kurze Beschreibung unserer Versuche folgt hier:

A. Manometerverfahren (nach *Eisler* und *Portheim*).

Wir benutzten ein einfaches Differentialmanometer nach *Barcroft*, die beiden Birnen faßten etwa 4 ccm. Die Birne *A* war ganz schwarz

---

[1]) *Eisler* und *Portheim*, diese Zeitschr. **135**, 293, 1923.

[2]) Was ja später von *Molisch*, Zeitschr. f. Bot. **17**, 577, 1925, gezeigt worden ist.

lackiert, die Birne *B* konnte mittels einer verschiebbaren Hülse oder durch Ausschalten der Lichtquelle verdunkelt werden. Außer Sonnenlicht wurden zwei 1000-Kerzen-Lampen in einer Entfernung von 25 cm benutzt. Es wurde in einem Thermostaten von 19° C unter fortwährendem Rühren gearbeitet. Die Manometerflüssigkeit war Ligroin, gefärbt mit Sudan III.

Aus Blindversuchen ging hervor, daß Ausschaltung der Lampen oder Herumschiebung der Hülse keine Druckänderung hervorbrachten.

Beide Birnen wurden mit 3 ccm Blattgereibsel von Lamium album in Carbonat-Bicarbonatmischung nach *Eisler* und *Portheim* gefüllt. Wurde Birne *B* belichtet, so entstand in ihr ein allmählich zunehmender Überdruck, der nach Verdunklung sistiert wurde und nach neuer Belichtung wieder anwuchs. Dasselbe Gereibsel gab, nachher mit Leuchtbakterien dem Lichte ausgesetzt, eine deutliche Lichtreaktion.

Eine schwache CO_2-Assimilation der Chlorophyll-Eiweißlösung sollte also gewiß auch manometrisch anzuzeigen sein.

Darauf wurden die eigentlichen Versuche angestellt. Chlorophyll-Eiweißlösungen wurden nach der Vorschrift von *Eisler* und *Portheim* mit Hilfe von Pferdeserum und Chlorophyll aus Lamium, Elodea und „Gras" hergestellt. Die Chlorophyll-Eiweiße wurden mittels Carbonat-Bicarbonatmischung, sowie mit 0,8% NaCl und CO_2-Durchperlung in Lösung gebracht. Außerdem war festgestellt worden, daß die verwendeten Chlorophyll-Eiweißlösungen einer Benzidinlösung gegenüber in Gegenwart von $MnCl_2$[1]) photodynamische Wirkungen zeigten, allerdings sehr viel schwächer als wahre Chlorophyllösungen.

In keinem einzigen Versuch zeigte sich eine Druckänderung, die auf eine mögliche CO_2-Reduktion der Chlorophyll-Eiweißlösung zurückzuführen wäre, obwohl vorher sorgfältig ein vollkommener Temperaturausgleich beobachtet wurde. Wohl wurde festgestellt, daß beim längeren Stehen im Lichte in der Birne *B* ein Unterdruck entstand, offenbar infolge der auftretenden photodynamischen Wirkungen, wodurch ein Teil des Chlorophylls oxydiert wurde.

B. Auch wurde das *Leuchtbakterienverfahren* benutzt, nachdem die obengenannten Versuche von *Molisch*, also die Assimilation abgetöteter Blätter, mit günstigem Erfolg wiederholt worden waren.

Die Versuchsanordnung war derart, daß nach Abschirmung der benutzten 1500-Kerzen-Lampe (in einer Entfernung von 15 cm) in einem lichtdichten Apparat, der sich in einem Dunkelzimmer befand, nur Lichteffekte, die von den Leuchtbakterien herrührten, zu beobachten waren. Eine Wasserkühlung war angebracht, um die Wärmestrahlen zu absorbieren.

---

[1]) *Noack*, Zeitschr. f. Bot. 17, 481, 1925.



Die Chlorophyll-Eiweiße wurden mittels der flüssigen Bakterienkulturen in Lösung gebracht und bei den meisten Versuchen noch CO_2 durchgeperlt. Kein einziger Versuch gab ein positives Resultat.

Die oben angeführten Versuche zeigen am deutlichsten, daß eine CO_2-Reduktion durch Eiweiß-Chlorophyllösungen nicht stattfindet. Trotzdem haben wir versucht, ob vielleicht mit der bekannten Bakterienmethode *Engelmanns* einige positive Resultate zu erringen wären. Konzentrierte Eiweiß-Chlorophyllösungen wurden hergestellt und mit diesen Lösungen einige Glaskapillaren gefüllt. Diese Kapillaren wurden in einen an Bakterien sehr reichen Tropfen gebracht und das Deckglas mit Paraffin-Vaselin verschlossen. Die mit Blattgereibsel gefüllten Kapillaren gaben bei Beleuchtung eine ausgezeichnete Reaktion. Die lebhaft schwärmenden Bakterien häuften sich um die Öffnungen der Kapillaren an. Derselbe Versuch mit Eiweiß-Chlorophyllösung gab ein vollständig negatives Resultat.

Wir sind also berechtigt, festzustellen, daß Chlorophyll-Eiweißlösungen, wie sie nach *Eisler* und *Portheim* hergestellt sind, nicht imstande sind, Kohlensäure zu reduzieren. Es bleibt nur noch übrig nachzuweisen, welches die vermutlichen Fehler in ihren Versuchen waren:

1. Die Manometerbirnen enthielten zu wenig Lösung, z. B. in einem qualitativen Versuch 10 ccm Lösung in einer Birne von 25 ccm, in einem quantitativen Versuch 10 ccm in einer Birne von 35 ccm, so daß kleine Temperaturschwankungen große Druckänderungen zustande brachten.

2. Nur die Lufttemperatur ist ungefähr konstant gehalten, während die mehrstündige Besonnung das Arbeiten im Thermostaten notwendig machte, was offenbar nicht geschehen ist, jedenfalls wird hierüber nichts mitgeteilt.

Wie uns scheint, wird eine Manometersistierung während der Verdunklung eher durch Temperatureinflüsse verursacht als durch eine Assimilationshemmung. Denn da das Wasser, in welches die Manometerbirnen eingesenkt worden sind, nicht gerührt wird, müssen kleine Temperaturänderungen auftreten. Daß der Druck mit der Temperatur ansteigt, ist auch leicht aus der fortwährenden Erwärmung des Wassers in der Nähe der Birnen zu erklären. Warum der Druck in der nicht geschwärzten Birne *A* größer war als in der Birne *B*, läßt sich jedoch nicht sagen.

3. Nach der Tabelle (S. 297) können wir eine O_2-Zunahme von etwa 1% in „mehreren Stunden“ in einer größeren Birne, als beim qualitativen Versuch benutzt wurde, feststellen; aus dieser Zunahme ergibt sich also ein Druckunterschied im Differentialmanometer, um-

gerechnet auf konstantes Volumen, von etwa 10 ccm Wasser. In 2 Stunden beträgt der gefundene Druckunterschied nach der Tabelle S. 596 nur einige Millimeter, also eine nicht sehr gute Übereinstimmung.

Zum Schluß sei uns gestattet, Herrn Prof. *F. A. F. C. Went* unseren ergebenen Dank auszusprechen für die Unterstützung, die wir bei unseren Versuchen empfunden haben.

Zusammenfassung.

Es wurde bewiesen, daß wässerige Eiweiß-Chlorophyllösungen nicht imstande sind, im Lichte Kohlensäure zu zersetzen, daß also die Versuche von Eisler und Portheim nicht richtig sind.

Darstellung von Sepiamelanin aus Sepiamelaninsäure.

Von

Oskar Adler (Karlsbad).

(Eingegangen am 25. März 1927.)

In den vorangegangenen Arbeiten[1]) wurde die Darstellung von Melaninen aus künstlich gewonnenen Melaninsäuren beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage zu beantworten gesucht, ob sich eine aus einem *Naturprodukt* gewonnene Melaninsäure nach derselben Methode in das entsprechende Melanin überführen läßt.

Als Ausgangsprodukt hierzu diente die Sepiamelaninsäure, welche in bekannter Weise aus dem Inhalt der Tintenbeutel von Sepien durch vorsichtige Kalischmelze gewonnen wurde.

Es ergab sich, daß die Überführung der Sepiamelaninsäure in das Sepiamelanin in gleicher Weise gelingt, und zwar durch zweistündiges Erhitzen der trockenen Sepiamelaninsäure im Wärmeschrank auf 270°. Bei dieser Gelegenheit sollte auch beobachtet werden, ob die natürliche Sepiamelaninsäure bezüglich der *Hemmung der Blutgerinnung* ein gleiches Verhalten zeigt wie die künstlich dargestellten Melaninsäuren[2]). Das Ergebnis dieser Versuche war, daß das leicht wasserlösliche Natriumsalz der Sepiamelaninsäure sowohl in vitro als auch beim lebenden Tier bei intravenöser Infusion die Gerinnung des Blutes in analoger Weise zu hemmen vermag wie die Natriumsalze der künstlich dargestellten Melaninsäuren. Allerdings ist die Giftigkeit im Vergleich zu anderen Melaninsäuren, insbesondere der Tyrosinmelaninsäure bei intravenöser Infusion beim Kaninchen erheblich größer. Während Kaninchen vom tyrosinmelaninsauren Natrium bis 0,078 g pro Kilogramm, in 1% Lösung infundiert, glatt vertrugen, wirkten 0,034 g sepiamelaninsaures Natrium unter sonst gleichen Versuchsbedingungen bereits tödlich. Nach subkutaner Injektion bei weißen Mäusen zeigten sich keine Vergiftungserscheinungen. Das Pigment verbreitete sich hierbei allmählich

---

[1]) Diese Zeitschr. **137**, 201, 1923; **141**, 304, 1923; **148**, 541, 1924.

[2]) *O. Adler* und *W. Wiechowski*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **92**, 22, 1922.



unter der Haut in weitem Umkreise und war noch nach einem Jahre bei den Tieren deutlich von außen sichtbar.

Das nach der oben erwähnten Methode erhaltene „künstliche Sepiamelanin“ war wie das natürliche Sepiamelanin in allen üblichen Lösungsmitteln unlöslich. Es ließ sich durch Kalischmelze wieder in die Sepiamelaninsäure aufspalten.

Es ergibt sich demnach aus diesen Versuchen ein weiteres Kriterium für die Gruppenzugehörigkeit der künstlich dargestellten Melaninsäuren mit den aus Naturprodukten gewonnenen insofern, als beide ein analoges Verhalten zeigen sowohl in bezug auf die Umwandlungsfähigkeit in die entsprechenden Melanine als auch bezüglich der Fähigkeit, die Gerinnung des Blutes zu hemmen.

Beschreibung der Versuche (auszugsweise).

Darstellung der Sepiamelaninsäure.

20 g getrocknetes Rohsepiamelanin aus den Tintenbeuteln von Sepien wurden in fein gepulvertem Zustande mit Benzol, das 15% Alkohol enthielt, kalt extrahiert. Das Extraktionsmittel wurde mit Alkohol und Äther ausgewaschen. Nach Verjagen des Äthers wurde die Masse vorerst mit Wasser, dann mit 5% Salzsäure ausgekocht, mit heißem Wasser chlorfrei gewaschen und mit Alkohol und Äther nachgewaschen. Das so gereinigte Produkt wurde durch 30 Minuten unter anhaltendem Rühren einer vorsichtigen Kalischmelze unterzogen, die erkaltete Schmelze in Wasser gelöst, vom Ungelösten dekantiert und die dunkle Lösung nach entsprechender Verdünnung mit Wasser filtriert. Der nicht gelöste Anteil wurde einer nochmaligen Kalischmelze unterzogen und in gleicher Weise verarbeitet. Aus den vereinigten Filtraten wurde die Sepiamelaninsäure durch Zusatz von Salzsäure ausgeflockt, mit Wasser bis zum Beginn des Kolloidwerdens gereinigt und schließlich noch mit Alkohol und Äther gewaschen. Das erhaltene Produkt wurde vorerst im Luftbad bei 40° und sodann im Exsikkator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Ausbeuten schwankten bei den verschiedenen Darstellungen zwischen 10 bis 27%.

Die getrocknete Sepiamelaninsäure ist in kaltem Wasser nicht löslich; die aus dem Natriumsalz durch Salzsäure frisch ausgefällte Sepiamelaninsäure geht bei anhaltendem Waschen mit Wasser allmählich kolloidal ins Filtrat. In Alkohol ist die Sepiamelaninsäure unlöslich, desgleichen in *Neuberg*schem Alkohol-Pyridingemisch[1]; dagegen ist sie in diesem Gemisch leicht löslich nach Zusatz von etwas Wasser. In reinem Pyridin ist die Substanz sehr wenig löslich, dagegen

[1]) *C. Neuberg,* Ber. d. deutsch. chem. Ges. **32**, 3384, 1899.

spielend löslich in pyridinhaltigem Wasser. Auch in Blutserum ist die Sepiamelaninsäure ziemlich löslich; bei der Hitzekoagulation flockt sie mit dem Koagulat aus.

Zur Elementaranalyse[1]) wurde jede Einwage noch gesondert bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum von 2 mm über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

1. 8,924 mg Substanz: 0,109 mg Asche, entsprechend 1,22%. 8,815 mg aschefreie Substanz: 18,23 mg CO_2, 2,08 mg H_2O, entsprechend 56,40% C, 2,64% H.

2. 5,771 mg Substanz: 0,119 mg Asche, entsprechend 2,06%. 5,652 mg aschefreie Substanz: 11,83 mg CO_2, 1,36 mg H_2O, entsprechend 57,08% C, 2,69% H.

3. 6,795 mg Substanz: 0,159 mg Asche, entsprechend 2,34%, 6,636 mg aschefreie Substanz: 0,520 mg $BaSO_4$, entsprechend 1,08% S.

4. 4,190 mg Substanz verbrauchten 2,52 ccm n/100 HCl, entsprechend 8,61% N (auf aschefreie Substanz bezogen).

5. 7,170 mg Substanz verbrauchten 4,32 ccm n/100 HCl, entsprechend 8,62% N (auf aschefreie Substanz bezogen).

Natriumsalz. 2 g Sepiamelaninsäure wurden in 30 ccm 5% Natronlauge gelöst, die Lösung in 50 ccm warmen Alkohol eingerührt. Nach dem Erkalten wurde der Niederschlag abgesaugt, mit Alkohol mehrmals sorfältig ausgekocht, mit Äther nachgewaschen und zuerst im Luftbad bei 35°, sodann im Exsikkator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet. Ausbeute quantitativ.

Mit diesem in Wasser leicht löslichen Natriumsalz wurden die oben erwähnten Tierversuche ausgeführt.

Überführung der Sepiamelaninsäure in „künstliches Sepiamelanin".

0,8 g der trockenen Sepiamelaninsäure wurden in locker bedecktem Uhrglase im Wärmschrank 2 Stunden auf 270° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die fein gepulverte Substanz mit 25 ccm 25% Natronlauge verrührt und unter häufigem Umrühren durch 24 Stunden unter der Einwirkung der Natronlauge belassen. Die wenig gefärbte Flüssigkeit wurde abgesaugt, der dunkle Niederschlag an der Saugpumpe mit viel Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und der Äther durch Nachsaugen von Luft verjagt. Sodann wurde der Niederschlag mit 25 ccm 12% Salzsäure in der Reibschale verrührt und unter oftmaligem Rühren 5 Stunden stehengelassen. Hierauf wurde die Substanz wieder mit viel Wasser bis zur Chlorfreiheit, dann mit Alkohol und Äther

---

[1]) Für die freundliche Ausführung der Mikroanalysen nach *Pregl* bin ich Herrn Dr. *O. Wintersteiner* (Graz) zu großem Danke verpflichtet.



gewaschen und vorerst im Luftbad bei 35⁰ und schließlich im Wärmschrank bei 120⁰ getrocknet.

Zur Elementaranalyse wurde jede Einwage gesondert im Vakuum über Schwefelsäure bei 115 bis 120⁰ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

1. 4,737 mg Substanz: 0,089 mg Asche, entsprechend 1,88 %. 4,648 mg aschefreie Substanz: 10,90 mg CO_2, 1,08 mg H_2O, entsprechend 63,96 % C, 2,60 % H.

2. 5,482 mg Substanz: 0,071 mg Asche, entsprechend 1,30 %. 5,411 mg aschefreie Substanz: 12,57 mg CO_2, 1,23 mg H_2O, entsprechend 63,36 % C, 2,54 % H.

3. 13,460 mg Substanz: 0,145 mg Asche, entsprechend 1,08 %. 13,315 mg aschefreie Substanz: 1,060 mg $BaSO_4$, entsprechend 1,09 % S.

4. 5,424 mg Substanz verbrauchten 4,98 ccm n/100 HCl entsprechend 13,04 % N (auf aschefreie Substanz bezogen).

5. 4,920 mg Substanz verbrauchten 4,53 ccm n/100 HCl, entsprechend 13,08 % N (auf aschefreie Substanz bezogen).

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 105.

Die Wirkung von Fleisch auf den respiratorischen Umsatz der mit Fett gefütterten Ratten. Ein Beitrag zur Physiologie der Leber.

Von

Tateyoshi Honda.

[Aus dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.]

(Eingegangen am 28. März 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Herstellung kohlehydratarmer, praktisch kohlehydratfreier Tiere nach der im Berner Physiologischen Institut üblichen Methode hat die Inangriffnahme einer Reihe von Fragestellungen nach Richtungen ermöglicht, welche Aussichten auf neue Erkenntnisse eröffneten. *Takahashi*[1]) hat auf diese Weise den autonomen Stoffwechsel des Gehirns untersucht; *Calvo Criado*[2]) prüfte unter den gleichen Bedingungen die Frage der etwaigen Zuckerbildung aus Fett. Schließlich hat *Okumura*[3]) den respiratorischen Stoffwechsel des kohlehydratarmen Tieres einer genauen Prüfung unterzogen. Bei den beiden zuletzt genannten Arbeiten kam aber noch ein weiterer Gesichtspunkt hinzu. Der experimentell herbeigeführte Zustand der Kohlehydratarmut änderte die Funktionsweise der Leber. Zum mindesten liegt reichlich Veranlassung dazu vor, an eine merkliche Verschiedenheit der Leistungsfähigkeit der Leber zu denken. Sowohl *Calvo Criado* wie *Okumura* haben, hierauf gestützt, versucht, einige der von ihnen gemachten Beobachtungen auf gestörte Leberfunktion zurückzuführen.

---

[1]) *Takahashi*, diese Zeitschr. **154**, 1444, 1924.
[2]) *Calvo Criado*, ebendaselbst **164**, 76, 1925.
[3]) *T. Okumura*, ebendaselbst **176**, 291, 1926.

Sobald man die Auffassung für nicht unberechtigt hält, daß eine von der Norm tief abweichende Ernährung in erster Linie die Leber in Mitleidenschaft zieht, ist ein methodischer Weg gegeben, die Funktionsweise der Leber auf dieser experimentellen Basis zu prüfen. Nun ist nicht allein die Kohlehydratarmut ein Regime, welches tief in das Geschehen in der Leber eingreift. Auch die Verfettung der Leber ist ein sicher für die Leber nicht gleichgültiger Zustand.

Die Ratte, welche bei allen bisherigen einschlägigen Arbeiten des Berner Physiologischen Instituts als Versuchstier diente, ist, wie *Boehm*[1]) zeigte, besonders geeignet, um in kurzer Zeit in ihr eine ausgesprochene Fettleber zu erzeugen. Schon nach 3 bis 4 Tagen Fütterung mit Speck konnte *Boehm* im histologischen Bild die massenhafte Einlagerung von Fett in den Leberzellen nachweisen. Hierauf wurde der von Prof. *Asher* angeregte Versuchsplan aufgebaut, der im wesentlichen darin bestand, daß die sogenannte spezifisch-dynamische Wirkung einer Fleischfütterung nach einer Normalernährung mit derjenigen verglichen werden sollte, wenn durch voraufgehende Fettfütterung die Leber in den Zustand der Fettleber gebracht worden war. Da Fett Glykogen verdrängt, ist auch diese Variable nicht außer acht zu lassen.

Gemäß diesem Plan mußten zunächst an normal gefütterten Tieren Grundumsatzversuche angestellt werden. Die Normalfütterung bestand aus kalorisch genügenden Mengen von Brot und Milch. Im nüchternen Zustande wurde der Grundumsatz nach der *Haldane-Asher*schen Methode bekannterweise bestimmt (Versuchsreihe A).

Nachdem in einer hinreichenden Anzahl von Versuchen der Grundumsatz festgestellt worden war, schritt ich zur Ermittlung der spezifisch-dynamischen Wirkung (Versuchsreihe B). Hierbei wurden den Tieren 10 g rohen Fleisches 1 Stunde vor dem betreffenden Versuch gegeben. Bis zum Abend vor dem Versuchstage erhielten die Tiere Milch und Brot, wie in der Versuchsreihe A, und blieben dann die Nacht über ohne Futter.

Nach Feststellung der spezifischen Wirkung schritt ich zur Fettfütterung der Tiere. Brot und Milch wurde ausgeschlossen und die Ratten nur mit klein zerschnittenem Speck, wie seinerzeit in *Boehms* Versuchen, ernährt. Die Speckernährung ist im Sinne der neueren Ernährungslehre keine vollwertige Ernährung, aber die Versuchsfristen sind zu kurz, um Mangelerscheinungen hervorzurufen, während sie zur Ausbildung der Fettleber mehr als genügt. Bei diesem neuen Ernährungsregime wurden wiederum in der üblichen Weise die Grundumsatzversuche angestellt (Versuchsreihe C).

---

[1]) *P. Boehm*, Zeitschr. f. Biol. 51, 409, 1908.

Nachdem ich durch diese Versuchsreihe C den Grundumsatz des Fett gefütterten Tieres kennengelernt hatte, folgte schließlich Versuchsreihe D. In dieser wurden, wie in Reihe B, aber bei der Grundnahrung der Reihe C, 1 Stunde vor dem Versuch, 10 g Fleisch gereicht. Hierdurch sollte die spezifisch-dynamische Wirkung unter den abgeänderten Ernährungsbedingungen mit ihrem Einfluß auf den Zustand der Leber untersucht werden.

Die Grundumsatzversuche der Reihe A erstreckten sich nach einer Vorperiode zur Einübung der Tiere auf eine durchschnittlich 14tägige Periode, in welcher je sechs Versuche an jedem einzelnen der sechs Versuchstiere angestellt wurden. Als Mittelwerte aus allen sechs Versuchsreihen ergaben sich: eine CO_2-Bildung pro Kilogramm und Stunde von 1,899 g, ein O_2-Verbrauch von 1,838 g, ein respiratorischer Quotient von 0,750 und eine aus diesen Werten errechnete Kalorienbildung von 6,205 Cal.

In der zweiten Versuchsreihe B, wo die spezifisch-dynamische Wirkung von Fleisch auf die normal ernährte Ratte geprüft wurde, ergaben sich als durchschnittliche Werte aus sechs Versuchsreihen in den gleichen Einheiten wie bisher eine CO_2-Bildung von 2,059 g, ein Sauerstoffverbrauch von 1,986 g, eine Kalorienzahl von 6,660 und ein respiratorischer Quotient von 0,759. Die durchschnittliche Steigerung des Umsatzes durch die Einnahme des Fleisches beläuft sich demgemäß auf 7,33%. Betrachtet man jedoch die Werte für die einzelnen Tiere, so ergibt sich, daß die spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei bestimmten Individuen ausgesprochen groß ist, und zwar stets, bei den anderen, der Minderzahl, aber klein. Dieses Verhalten muß bei den späteren Vergleichen berücksichtigt werden. Der respiratorische Quotient blieb auf der gleichen Größe wie in der voraufgehenden Versuchsreihe.

Die darauf folgende Versuchsreihe C bringt die Resultate bei anhaltender Speckfütterung. Der Grundumsatz sinkt gegenüber der Versuchsreihe A um durchschnittlich 8,9%. Pro Kilogramm und Stunde betragen die Mittelwerte aus sechs Versuchsreihen: CO_2-Bildung = 1,681 g, Sauerstoffverbrauch = 1,681 g, Kalorienzahl = 5,653. Der respiratorische Quotient ist gleichfalls erniedrigt, aber nicht sehr erheblich, auf 0,726.

Diese Erniedrigung des Grundumsatzes erinnert an die Verminderung, die man gelegentlich bei der sogenannten endogenen Fettsucht sieht[1]). Man könnte auch geneigt sein, an die interessanten Beobachtungen von *Gigon*[2]) zu denken, der die Steigerung der Wärme-

---

[1]) Literatur bei *Grafe*, Ergebn. d. Physiol. **21**, II, 1, 1923.
[2]) *A. Gigon*, Pflügers Arch. **140**, 509, 1911.



Tabelle I.

Ratte Nr. 1. ♂.

Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur °C	Fütterung g	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std. g	O_2 pro kg und Std. g	Kalorienbildung pro kg und Std.	Bemerkungen
A. Erhaltungsstoffwechsel bei Brot- und Milchernährung.												
1. VII.	4	26	Brot, Milch	177,33	1,34	1,64	1,59	0,754	1,840	1,773	5,972	Brot und Milch jeden Tag mäßig gegeben. Versuch geschah in nüchternem Zustande.
8. VII.	4	26	„ „	185,60	1,27	1,50	1,45	0,776	2,095	1,959	6,633	
10. VII.	4	26	„ „	188,88	0,96	1,47	1,40	0,762	1,955	1,862	6,306	
13. VII.	4	26	„ „	204,06	1,20	1,82	1,72	0,768	2,230	2,108	7,139	
15. VII.	4	26	„ „	203,23	1,25	1,60	1,56	0,745	1,970	1,921	6,482	
17. VII.	4	26	„ „	208,88	1,36	1,64	1,59	0,747	1,971	1,911	6,448	
							Mittelwert:	0,759	2,010	1,922	6,500	
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei A.												
20. VII.	4	26	Fleisch 2,0	218,17	1,17	1,72	1,66	0,753	1,972	1,904	6,435	Fleischfütterung geschah jedesmal 1 Std. vor dem Versuch in nüchternem Zustande.
27. VII.	4	26	„ 8,0	235,07	1,58	1,94	1,83	0,770	2,064	1,947	6,591	
29. VII.	4	26	„ 10,0	233,03	1,78	2,07	1,89	0,795	2,221	2,028	6,917	
31. VII.	4	26	„ 10,0	233,19	1,66	2,06	1,91	0,783	2,210	2,050	6,970	
3. VIII.	4	26	„ 10,0	236,23	2,09	2,05	1,94	0,769	2,171	2,055	6,960	
							Mittelwert:	0,774	2,127	1,996	6,774	
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . + 4,22 %												
C. Erhaltungsstoffwechsel bei Fetternährung.												
10. VIII.	4	26	Fett 3,8	231,47	1,07	1,56	1,57	0,722	1,688	1,700	5,711	5. VIII. Fett 9,0 g 6. VIII. „ 2,0 g 7. VIII. „ 6,0 g 8. VIII. „ 9,9 g 9. VIII. „ 6,3 g
11. VIII.			„ 6,8									
12. VIII.	4	25	„ 4,0	225,50	1,57	1,64	1,64	0,726	1,822	1,822	6,125	
13. VIII.			„ 6,5									
14. VIII.	4	26	„ 10,0	224,80	1,35	1,60	1,66	0,700	1,786	1,853	6,203	Fetternähr. begann 5 Tage vor dem ersten Ver-
1[illegible] VIII.			[illegible]									

18. VIII.			„	3,3									[illegible]
19. VIII.	4	26	„	3,0	217,13	1,14	1,42	1,46	0,707	1,636	1,680	5,627	… wurde in nüchternem Zustande wie bei Versuch A ausgeführt.
20. VIII.			„	2,6									
21. VIII.	4	26	„	7,0	207,01	1,01	1,24	1,26	0,714	1,498	1,522	5,099	
22. VIII.			„	8,5									
23. VIII.			„	1,6									
24. VIII.	4,5	26	„	2,4	210,46	0,94	1,54	1,56	0,718	1,630	1,651	5,532	
25. VIII.			„	1,4									
26. VIII.	5	26	„	2,0	201.75	1,76	1,64	1,66	0,717	1,632	1,652	5,535	
								Mittelwert:	0,714	1,656	1,684	5,661	

Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . — 12,91 %.

D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei C.

28. VIII.	4	26	Fleisch	10,0	197,20	1,38	1,39	1,36	0,742	1,764	1,726	5,823	Fleisch wurde 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande gegeben. Fetternährung geschah wie bei Versuch C.
			Fett	5,5									
29. VIII.			„	6,4									
30. VIII.			„	3,4									
31. VIII.	4	26	Fleisch	8,0	207,02	1,13	1,41	1,34	0,764	1,703	1,618	5,481	
			Fett	6,4									
1. IX.			„	3,0									
2. IX.	4	26	Fleisch	9,0	209,69	1,44	1,50	1,52	0,717	1,794	1,818	6,092	
			Fett	7,5									
3. IX.			„	3,0									
4. IX.	4	26	Fleisch	8,0	209,15	1,25	1,43	1,45	0,716	1,711	1,734	5,812	
			Fett	7,0									
5. IX.			„	2,5									
6. IX.			„	1,2									
7. IX.	4	26	Fleisch	9,1	209,36	1,17	1,42	1,42	0,726	1,699	1,699	5,709	
			Fett	6,0									
8. IX.			„	3,0									
9. IX.	4	26	Fleisch	8,0	211,04	1,29	1,49	1,53	0,707	1,765	1,813	6,070	
			Fett	6,0									
								Mittelwert:	0,729	1,739	1,735	5,831	

Vergleich mit Versuch C, ausgedrückt in % . . . . + 3,0 %
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . — 10,29 %

\+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle II.

Ratte Nr. 2. ♂.

Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur °C	Fütterung g	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std. g	O_2 pro kg und Std. g	Kalorienbildung pro kg und Std.	Bemerkungen
						A. Erhaltungsstoffwechsel bei Brot- und Milchernährung.						
5. VII.	4	26	Brot, Milch	212,09	1,17	1,59	1,48	0,780	1,875	1,745	5,933	Brot und Milch jeden Tag mäßig gegeben. Versuch geschah in nüchternem Zustande.
7. VII.	4	26	„ „	220,43	1,72	1,74	1,66	0,763	1,977	1,887	6,389	
9. VII.	4	26	„ „	215,61	1,05	1,63	1,61	0,735	1,895	1,872	6,364	
12. VII.	4	26	„ „	225,17	1,02	1,66	1,64	0,735	1,844	1,822	6,136	
14. VII.	4	26	„ „	229,31	1,35	1,73	1,71	0,735	1,889	1,867	6,287	
16. VII.	4	26	„ „	235,28	1,30	1,72	1,71	0,730	1,830	1,819	6.126	
							Mittelwert:	0,746	1,885	1,835	6,196	
						B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei A.						
21. VII.	4	26	Fleisch 10,0	250,59	1,61	1,93	1,93	0,726	1,930	1,930	6,487	Fleischfütterung geschah jedesmal 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande.
26. VII.	4	26	„ 9,0	268,15	1,74	2,05	2,00	0,745	1,912	1,866	6,294	
28. VII.	4	26	„ 10,0	267,20	1,54	2,06	2,00	0,748	1,929	1,873	6,318	
30. VII.	4	26	„ 10,0	273,35	1,74	2,13	2,08	0,744	1,951	1,905	6,426	
2. VIII.	4	26	„ 10,0	279,60	1,43	2,25	2,16	0,756	2,016	1,935	6,543	
4. VIII.	4	26	„ 10,0	275,82	1.96	2.18	2.06	0,768	1,982	1,873	6,343	
							Mittelwert:	0,747	1,953	1,897	6,402	
					Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %				+ 3,34 %			
						C. Erhaltungsstoffwechsel bei Fetternährung.						
11. VIII.	4	25	Fett 5,2	265,81	1,24	2,01	1,90	0,764	1,896	1,792	6,071	6. VIII. Fett 3,6 g
12. VIII.			„ 6,0									7. VIII. „ 10,0 g
13. VIII.	4	25	„ 9,9	257,73	1,81	1,78	1,70	0,761	1,732	1,654	5,601	8. VIII. „ 3,0 g 9. VIII. „ 10,0 g

17. VIII.			„ 0,2									... im Verlauf von dieser ganzen Versuchsreihe, jeder Versuch wurde in nücht. Zustande wie bei Versuch A ausgeführt.
18. VIII.	4	25	„ 3,8	251,22	1,55	1,66	1,70	0,709	1,653	1,693	5,670	
							Mittelwert:	0,746	1,739	1,689	5,703	

Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . — 7,96 %

D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei C.

20. VIII.	4	26	Fleisch 10,0	261,46	1,31	1,85	1,77	0,759	1,772	1,695	5,731	Fleisch wurde 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande gegeben. Fetternährung geschah wie bei Versuch C.
			Fett 7,0									
21. VIII.			„ 7,2									
22. VIII.			„ 8,0									
23. VIII.	4	26	Fleisch 10,0	259,58	1,22	1,82	1,85	0,731	1,757	1,786	6,014	
			Fett 2,2									
24. VIII.			„ 2,0									
25. VIII.	4	26	Fleisch 10,0	256,14	1,27	1,78	1,80	0,718	1,738	1,758	5,890	
			Fett 10,0									
26. VIII.			„ 3,4									
27. VIII.	4	26	Fleisch 10,0	254,12	1,29	1,81	1,81	0,726	1,782	1,782	5,988	
			Fett 8,2									
28. VIII.			„ 6,4									
29. VIII.			„ 2,4									
30. VIII.	4	26	Fleisch 10,0	256,92	1,44	1,72	1,70	0,735	1,680	1,660	5,591	
			Fett 8,5									
31. VIII.			„ 0,5									
1. IX.	4	26	Fleisch 10,0	253,84	1,34	1,68	1,72	0,709	1,660	1,700	5,691	
			Fett 8,5									
2. IX.			„ 2,5									
3. IX.	4	26	Fleisch 10,0	251,90	1,40	1,61	1,64	0,713	1,604	1,634	5,473	
			Fett 7,2									
4. IX.			„ 7,5									
5. IX.			„ 6,0									
6. IX.	4	26	Fleisch 10,0	255,11	1,54	1,67	1,62	0,748	1,637	1,588	5,359	
			Fett 2,8									
							Mittelwert:	0,726	1,694	1,701	5,715	

Vergleich mit Versuch C, ausgedrückt in % . . . . + 0,21 %
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . — 7,76 %

\+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle III. Ratte Nr. 3. ♂.

Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur °C	Fütterung g	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std. g	O_2 pro kg und Std. g	Kalorienbildung pro kg und Std.	Bemerkungen
				A. Erhaltungsstoffwechsel bei Brot- und Milchernährung.								
3. VII.	4	26	Brot, Milch	231,46	1,53	1,67	1,64	0,739	1,807	1,775	5,977	Brot und Milch jeden Tag mäßig gegeben. Versuch geschah in nüchternem Zustande.
6. VII.	4	25	„ „	237,65	1,29	1,68	1,61	0,758	1,772	1,700	5,741	
8. VII.	4	25	„ „	236,91	1,34	1,70	1,63	0,757	1,802	1,727	5,837	
10. VII.	4	26	„ „	343,71	1,33	1,78	1,71	0,756	1,831	1,759	5,811	
13. VII.	4	26	„ „	254,18	1,25	1,88	1,84	0,742	1,850	1,812	6,113	
15. VII.	4	26	„ „	254,91	1,44	2,04	1,98	0,748	2,008	1,949	6,575	
17. VII.	4	26	„ „	255,09	1,48	1,88	1,85	0,738	1,843	1,814	6,118	
							Mittelwert:	0,748	1,844	1,791	6,023	
				B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei A.								
20. VII.	4	26	Fleisch 8,0	269,56	1,91	2,24	2,19	0,743	2,082	2,035	6,867	Fleischfütterung geschah jedesmal 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande.
22. VII.	4	26	„ 8,0	270,82	1,68	2,21	2,20	0,729	2,046	2,037	6,847	
24. VII.	4	26	„ 8,0	272,62	2,02	2,36	2,28	0,753	2,169	2,094	7,084	
27. VII.	4	26	„ 10,0	279,25	1,95	2,36	2,25	0,762	2,115	2,016	6,828	
29. VII.	4	26	„ 10,0	278,13	1,76	2,32	2,20	0,766	2,086	1,979	6,701	
31. VII.	4	25	„ 9,0	280,60	1,69	2,35	2,30	0,742	2,098	2,058	6,928	
3. VIII.	4	26	„ 9,7	283,03	2,29	2,40	2,30	0,758	2,120	2,032	6,868	
							Mittelwert:	0,750	2,102	2,036	6,874	
				Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % · · · · · · · · ·					+ 14,13 %			
				C. Erhaltungsstoffwechsel bei Fetternährung.								
10. VIII.	4	26	Fett 3,8	270,21	2,31	1,96	1,98	0,719	1,816	1,833	6,144	5. VIII. Fett 6,5 g 6. „ „ 8,7 g 7. „ „ 2,5 g 8. „ „ 8,0 g 9. „ „ 10,0 g Fetternähr. begann 5 Tage vor dem 1. Versuch und erfolgte jeden Tag im Verlauf dieser ganzen Versuchsreihe, jeder Versuch wurde in nüchternem Zustande wie bei Versuch A ausgeführt.
11. VIII.			„ 6,8									
12. VIII.	4	25	„ 4,2	279,78	1,96	1,88	1,85	0,738	1,685	1,658	5,583	
13. VIII.			„ 6,5									
14. VIII.	4	26	„ 10,0	274,60	1,97	1,97	2,03	0,705	1,797	1,852	6,202	
15. VIII.			„ 3,2									
16. VIII.			„ 3,0									
17. VIII.	4	26	„ 5,0	271,93	2,16	1,73	1,73	0,726	1,596	1,596	5,364	
18. VIII.			„ 3,3									
19. VIII.	4	26	„ 3,2	264,00	1,77	1,78	1,72	0,751	1,686	1,629	5,506	
20. VIII.			„ 3,6									
21. VIII.	4	26	„ 7,0	254,89	1,45	1,50	1,48	0,736	1,477	1,457	4,905	
22. VIII.			„ 8,5									
23. VIII.			„ 4,6									
[illegible]	[illegible]	[illegible]	„ [illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	

27. VIII.			„ 3,0									
28. VIII.	4	26	„ 7,4	252,24	1,46	1,53	1,53	0,726	1,518	1,518	5,102	
29. VIII.			„ 1,4									
30. VIII.			„ 9,8									
31. VIII.	4	26	„ 1,2	251,20	1,41	1,64	1,68	0,709	1,634	1,673	5,603	
1. IX.			„ 2,0									
2. IX.	4	26	„ 7,0	234,96	1,41	1,33	1,39	0,695	1,421	1,485	4,963	
							Mittelwert:	0,720	1,632	1,646	5,527	

Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . —8,24 %

D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei C.

4. IX.	4	26	Fleisch 10,0	245,61	1,49	1,60	1,59	0,731	1,632	1,622	5,464	Fleisch wurde 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande gegeben. Fetternährung geschieht wie bei C.
			Fett 6,0									
5. IX.			„ 6,0									
6. IX.			„ 4,5									
7. IX.	4	26	Fleisch 10,0	252,67	1,44	1,98	1,98	0,726	1,964	1,964	6,602	
			Fett 4,5									
8. IX.			„ 2,2									
9. IX.	4	26	Fleisch 8,6	248,26	1,73	1,47	1,55	0,689	1,482	1,562	5,211	
			Fett 5,5									
10. IX.			„ 3,0									
11. IX.	4	26	Fleisch 10,0	259,82	1,58	1,92	1,87	0,745	1,853	1,805	6,090	
			Fett 7,5									
12. IX.			„ 2,5									
13. IX.	4	26	Fleisch 10,0	259,86	1,62	1,88	1,91	0,715	1,815	1,843	6,178	
			Fett 7,0									
14. IX.			„ 2,5									
15. IX.	4	26	Fleisch 10,0	258,35	1,62	1,79	1,82	0,715	1,735	1,764	5,909	
			Fett 8,7									
16. IX.			„ 8,5									
17. IX.	4	26	Fleisch 10,0	263,97	1,66	1,82	1,82	0,726	1,730	1,730	5,815	
			Fett 8,2									
18. IX.			„ 6,3									
19. IX.			„ 3,4									
20. IX.	4	26	Fleisch 10,0	269,79	1,68	1,96	2,01	0,708	1,822	1,868	6,255	
			Fett 0									
							Mittelwert:	0,719	1,754	1,770	5,940	

Vergleich mit Versuch C, ausgedrückt in % . . . . + 7,47 %

Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . —1,38 %

+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle IV.

Ratte Nr. 4. ♂.

Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur °C	Fütterung g	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std. g	O_2 pro kg und Std. g	Kalorienbildung pro kg und Std.	Bemerkungen
A. Erhaltungsstoffwechsel bei Brot- und Milchernährung.												
30. VI.	4	26	Brot, Milch	168,95	0,47	1,24	0,89	0,802	1,845	1,671	5,700	Brot und Milch mäßig jeden Tag gegeben. Versuch geschah in nüchternem Zustande
5. VII.	4	26	„ „	168,44	0,78	1,24	1,09	0,845	1,888	1,622	5,577	
7. VII.	4	26	„ „	173,29	1,02	1,32	1,24	0,773	1,907	1,792	6,066	
9. VII.	4	26	„ „	175,52	0,94	1,33	1,21	0,798	1,900	1,729	5,896	
12. VII.	4	26	„ „	178,09	0,84	1,29	1,29	0,726	1,812	1,812	6,090	
14. VII.	4	26	„ „	182,64	1,12	1,35	1,31	0,748	1,854	1,799	6,071	
16. VII.	4	26	„ „	185,44	1,35	1,40	1,37	0,742	1,892	1,851	6,247	
							Mittelwert:	0,776	1,871	1,754	5,950	
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei A.												
23. VII.	4	26	Fleisch 6,4	197,39	1,27	1,48	1,38	0,779	1,878	1,751	5,929	Fleischfütterung geschah jedesmal 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande
26. VII.	4	26	„ 8,1	205,18	1,43	1,60	1,53	0,777	1,951	1,823	6,173	
28. VII.	4	26	„ 10,0	205,29	1,37	1,63	1,50	0,789	1,988	1,829	6,219	
30. VII.	4	25	„ 10,0	206,53	1,26	1,77	1,67	0,770	2,148	2,027	6,861	
2. VIII.	4	26	„ 8,7	217,19	1,41	1,74	1,73	0,731	2,005	1,993	6,712	
3. VIII.	4	26	„ 9,8	217,01	1,46	1,73	1,63	0,771	1,993	1,878	6,357	
6. VIII.	4	26	„ 10,0	217,18	1,68	1,77	1,67	0,769	2,039	1,924	6,516	
9. VIII.	4	26	„ 10,0	215,79	1,45	1,81	1,69	0,778	2,105	1,965	6,642	
							Mittelwert:	0,771	2,013	1,899	6,426	
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %										+ 8,0 %		
C. Erhaltungsstoffwechsel bei Fetternährung.												
11. VIII.	4	25	Fett 10,0	216,63	1,38	1,59	1,53	0,754	1,840	1,771	5,986	9. VIII. Fett 7,4 g 10. VIII. „ 6,0 g Fetternähr. begann 2 Tage vor dem ersten Ver-
12. VIII.			„ 6,0									
13. VIII.	4	26	„ 8,0	219,24	1,42	1,61	1,58	0,757	1,838	1,804	6,097	

14. VIII.			„ [illegible]									auch und erfolgte jeden Tag im Verlauf dieser ganzen Versuchsreihe, aber jeder Versuch wurde in nüchternem Zustande wie bei Versuch A ausgeführt
15. VIII.			„ 1,2									
16. VIII.	4	26	„ 4,5	216,93	1,32	1,48	1,45	0,741	1,713	1,678	5,662	
17. VIII.			„ 2,0									
18. VIII.	4	25	„ 8,0	212,78	0,67	1,35	1,43	0,685	1,592	1,686	5,624	
19. VIII.			„ 0,2									
20. VIII.	4	26	„ 8,2	212,73	1,13	1,34	1,33	0,731	1,580	1,568	5,271	
21. VIII.			„ 2,2									
22. VIII.			„ 2,0									
23. VIII.	4	26	„ 5,3	209,52	1,25	1,44	1,48	0,706	1,723	1,770	5,927	
24. VIII.			„ 0,3									
25. VIII.	4	26	„ 5,7	207,43	1,28	1,32	1,34	0,715	1,594	1,618	5,423	
26. VIII.			„ 1,5									
27. VIII.	4	26	„ 8,7	200,86	1,32	1,36	1,36	0,726	1,700	1,700	5,714	
							Mittelwert:	0,727	1,698	1,699	5,713	

Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . —3,98 %

D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei C.

30. VIII.	4	26	Fleisch 6,0 Fett 6,4	203,17	1,21	1,31	1,32	0,721	1,613	1,626	5,464	Fleisch wurde 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande gegeben, Fetternährung geschah wie bei Versuch C
31. VIII.			„ 0									
1. IX.	4	26	Fleisch 7,0 Fett 5,5	202,19	1,08	1,27	1,29	0,715	1,572	1,596	5,350	
2. IX.			„ 1,8									
3. IX.	4	26	Fleisch 7,0 Fett 7,0	201,47	1,44	1,21	1,24	0,709	1,505	1,542	5,164	
4. IX.			„ 7,0									
5. IX.			„ 2,0									
6. IX.	4	26	Fleisch 8,0 Fett 3,0	202,22	1,19	1,35	1,33	0,737	1,671	1,646	5,543	
7. IX.			„ 1,0									
8. IX.	4	26	Fleisch 5,0 Fett 4,0	196,77	1,20	1,21	1,25	0,703	1,579	1,594	5,339	
							Mittelwert:	0,717	1,588	1,601	5,372	

Vergleich mit Versuch C, ausgedrückt in % . . . . —5,97 %

Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . —9,71 %

\+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle V.

Ratte Nr. 5. ♂.

Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur °C	Fütterung g	Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std. g	O_2 pro kg und Std. g	Kalorienbildung pro kg und Std.	Bemerkungen
				A. Erhaltungsstoffwechsel bei Brot- und Milchernährung.								
5. VII.	4	26	Brot, Milch	231,17	1,18	1,48	1,46	0,736	1,602	1,580	5,321	Brot und Milch jeden Tag mäßig gegeben. Versuch geschah in nüchternem Zustande.
7. VII.	4	26	„ „	227,87	1,43	1,52	1,47	0,751	1,674	1,619	5,472	
9. VII.	4	26	„ „	229,17	1,32	1,72	1,68	0,744	1,878	1,834	6,188	
12. VII.	4	26	„ „	243,73	1,09	1,71	1,68	0,739	1,759	1,728	5,820	
14. VII.	4	26	„ „	250,28	1,28	1,74	1,75	0,722	1,740	1,750	5,882	
16. VII.	4	26	„ „	251,26	1,55	1,87	1,87	0,726	1,863	1,863	6,260	
							Mittelwert:	0,736	1,753	1,729	5,824	
				B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei A.								
21. VII.	4	26	Fleisch 10,0	269,36	1,63	2,05	2,04	0,730	1,905	1,896	6,385	Fleischfütterung geschah jedesmal 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande.
23. VII.	4	26	„ 8,0	272,53	1,60	2,05	2,00	0,744	1,884	1,838	6,202	
26. VII.	4	26	„ 10,0	290,03	1,57	2,05	2,01	0,741	1,767	1,733	5,846	
28. VII.	4	26	„ 10,0	293,36	1,47	2,38	2,23	0,775	2,031	1,903	6,441	
30. VII.	4	25	„ 10,0	296,59	1,72	2,38	2,25	0,762	2,040	1,901	6,436	
2. VIII.	4	26	„ 10,0	306,11	1,53	2,43	2,32	0,761	1,985	1,896	6,420	
4. VIII.	4	26	„ 10,0	302,56	1,80	2,45	2,35	0,757	2,028	1,945	6,576	
							Mittelwert:	0,753	1,949	1,873	6,329	
				Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . + 8,67 %								
				C. Erhaltungsstoffwechsel bei Fetternährung.								
11. VIII.	4	25	Fett 5,6	297,43	1,74	2,00	1,94	0,748	1,684	1,633	5,510	6. VIII. Fett 9,0 g 7. VIII. „ 3,5 g 8. VIII. „ 5,0 g 9. VIII. „ 10,0 g
12. VIII.			„ 8,0									
13. VIII.			„ 1,2									
14. VIII.			„ 4,1									

[illegible]			"	[illegible]									[illegible] erfolgte jeden Tag im Verlauf dieser ganzen Versuchsreihe, jeder Versuch wurde in nüchternem Zustande wie bei Versuch A ausgeführt.
17. VIII.			"	2,2									
18. VIII.			"	7,0									
19. VIII.			"	3,5									
20. VIII.	4	26	"	6,2	274,72	1,40	1,64	1,67	0,713	1,496	1,524	5,106	
21. VIII.			"	6,9									
22. VIII.			"	7,8									
23. VIII.	4	26	"	2,7	271,13	1,32	1,69	1,70	0,712	1,559	1,579	5,291	
24. VIII.			"	0,4									
25. VIII.	4	26	"	10,0	264,84	1,30	1,58	1,59	0,722	1,496	1,506	5,061	
26. VIII.			"	0									
27. VIII.	4	26	"	8,0	260,00	1,38	1,55	1,56	0,722	1,491	1,500	5,042	
								Mittelwert:	0,723	1,545	1,548	5,202	

Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . — 10,68 %

D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei C.

30. VIII.	4	26	Fleisch	10,0	263,08	1,25	1,61	1,63	0,717	1,530	1,549	5,192	Fleisch wurde 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande gegeben. Fetternährung geschah wie bei Versuch C.
			Fett	8,0									
31. VIII.			"	0,3									
1. IX.	4	26	Fleisch	10,0	259,39	1,12	1,58	1,60	0,717	1,525	1,544	5,175	
			Fett	9,0									
2. IX.			"	2,0									
3. IX.	4	26	Fleisch	10,0	262,06	1,37	1,66	1,65	0,731	1,584	1,574	5,302	
			Fett	6,5									
4. IX.			"	7,0									
5. IX.			"	7,0									
6. IX.	4	26	Fleisch	10,0	270,01	1,44	1,62	1,66	0,709	1,500	1,537	5,146	
			Fett	6,0									
7. IX.			"	3,0									
8. IX.	4	26	Fleisch	10,0	268,55	1,39	1,65	1,69	0,709	1,539	1,577	5,279	
			Fett	7,0									
								Mittelwert:	0,716	1,535	1,556	5,219	

Vergleich mit Versuch C, ausgedrückt in % . . . . + 0,33 %
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . — 10,39 %
+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle VI.

Ratte Nr. 6. ♂.

Datum 1926	Versuchsdauer Std.	Temperatur °C	Fütterung g		Körpergewicht g	H_2O-Bildung g	CO_2-Bildung g	O_2-Verbrauch g	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std. g	O_2 pro kg und Std. g	Kalorienbildung pro kg und Std.	Bemerkungen
A. Erhaltungsstoffwechsel bei Brot- und Milchernährung.													
1. VII.	4	26	Brot, Milch		174,42	1,66	1,57	1,52	0,750	2,256	2,184	7,382	Brot und Milch jeden Tag mäßig gegeben. Versuch geschah in nüchternem Zustande.
6. VII.	4	25	„ „		180,53	1,33	1,46	1,45	0,731	2,028	2,014	6,782	
8. VII.	4	25	„ „		185,97	1,24	1,45	1,37	0,768	1,960	1,851	6,270	
10. VII.	4	26	„ „		191,27	1,16	1,44	1,42	0,736	1,885	1,859	6,259	
13. VII.	4	26	„ „		197,76	1,34	1,65	1,65	0,726	2,094	2,094	6,994	
15. VII.	4	26	„ „		198,42	1,23	1,56	1,57	0,722	1,970	1,982	6,663	
17. VII.	4	26	„ „		197,20	1,77	1,60	1,59	0,731	2,030	2,018	6,795	
								Mittelwert:	0,738	2,032	2,000	6,735	
B. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei A.													
20. VII.	4	26	Fleisch	4,0	206,28	1,79	1,66	1,57	0,768	2,015	1,905	6,453	Fleischfütterung geschah jedesmal 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande.
22. VII.	4	26	„	2,0	200,53	1,85	1,70	1,71	0,722	2,124	2,136	7,180	
24. VII.	4	26	„	6,5	203,93	1,60	1,90	1,88	0,751	2,394	2,310	7,826	
27. VI.	4	25	„	10,0	198,52	1,64	1,72	1,66	0,753	2,172	2,096	7,085	
29. VII.	4	26	„	6,4	191,97	1,56	1,66	1,57	0,768	2,173	2,055	6,960	
31. VII.	4	25	„	6,7	191,99	1,35	1,77	1,67	0,769	2,317	2,186	7,403	
3. VIII.	4	26	„	9,5	199,90	1,51	1,80	1,69	0,773	2,261	2,123	7,687	
								Mittelwert:	0,758	2,208	2,115	7,156	
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %										+ 6,25 %			
C. Erhaltungsstoffwechsel bei Fetternährung.													
10. VIII.	4	26	Fett	5,8	195,87	1,63	1,42	1,44	0,716	1,821	1,846	6,186	5. VIII. Fett 2,4 g 6. VIII. „ 4,5 g 7. VIII. „ 0,5 g 8. VIII. „ 2,3 g 9. VIII. „ 6,0 g
11. VIII.			„	4,7									
12. VIII.	4	25	„	1,7	185,12	1,81	1,40	1,36	0,747	1,892	1,838	6,201	
13. VIII.			„	9,7									

17. VIII.	4	26	„	1,0	180,96	1,19	1,26	1,28	0,715	1,750	1,778	5,957	... Tag im Verlauf dieser ganzen Versuchsreihe, jeder Versuch wurde in nüchternem Zustande wie bei Versuch A ausgeführt.
18. VIII.			„	6,5									
19. VIII.	4	26	„	0,4	174,78	1,24	1,22	1,19	0,744	1,753	1,710	5,769	
								Mittelwert:	0,727	1,818	1,818	6,110	

Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . — 9,28 %

D. Spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei gleicher Ernährung wie bei C.

21. VIII.	4	26	Fleisch	7,7	180,50	1,01	1,24	1,23	0,732	1,722	1,708	5,753	Fleisch wurde 1 Stunde vor dem Versuch in nüchternem Zustande gegeben. Fetternährung geschah wie bei Versuch C.
			Fett	5,7									
22. VIII.			„	3,5									
23. VIII.			„	1,4									
24. VIII.	4,5	26	Fleisch	8,0	173,64	1,25	1,41	1,46	0,701	1,811	1,875	6,279	
			Fett	0,8									
25. VIII.			„	1,7									
26. VIII.	4,5	26	Fleisch	10,0	174,15	1,33	1,37	1,42	0,653	1,750	1,945	6,452	
			Fett	1,0									
27. VIII.			„	1,3									
28. VIII.	4	26	Fleisch	8,0	167,76	1,06	1,15	1,15	0,726	1,722	1,722	5,786	
			Fett	6,5									
29. VIII.			„	7,4									
30. VIII.			„	3,5									
31. VIII.	4	26	Fleisch	9,5	173,77	1,04	1,22	1,24	0,714	1,763	1,792	6,004	
			Fett	5,5									
1. IX.			„	1,0									
2. IX.	4	26	Fleisch	10,0	173,34	1,09	1,22	1,27	0,697	1,763	1,835	6,133	
			Fett	6,0									
3. IX.			„	6,0									
4. IX.	4	26	Fleisch	10,0	175,62	1,06	1,24	1,24	0,726	1,771	1,771	5,954	
5. IX.			Fett	6,0									
6. IX.			„	0,5									
7. IX.	4	26	Fleisch	10,0	175,05	1,09	1,27	1,29	0,715	1,814	1,843	6,175	
			Fett	2,5									
								Mittelwert:	0,708	1,765	1,811	6,067	

Vergleich mit Versuch C, ausgedrückt in % . . . . — 0,7 %
Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in % . . . . — 9,92 %

\+ vermehrt, — vermindert.

Tabelle VII.

Übersichtstabelle.

Tier Nr.	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und Std. g	O_2 pro kg und Std. g	Kalorienbildung pro kg und Std.
		A.		
1	0,758	2,010	1,922	6,500
2	0,746	1,885	1,835	6,196
3	0,748	1,844	1,791	6,023
4	0,776	1,871	1,754	5,950
5	0,736	1,753	1,729	5,824
6	0,738	2,032	2,000	6,735
Mittelwert:	0,750	1,899	1,838	6,205
		B.		
1	0,774	2,127	1,996	6,774
2	0,747	1,953	1,897	6,402
3	0,750	2,102	2,036	6,874
4	0,771	2,013	1,899	6,426
5	0,753	1,949	1,873	6,329
6	0,758	2,208	2,115	7,156
Mittelwert:	0,759	2,059	1,986	0,660
	Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %			+ 7,33 %
		C.		
1	0,714	1,656	1,684	5,661
2	0,746	1,739	1,689	5.703
3	0,720	1,632	1,646	5,527
4	0,727	1,698	1,699	5,713
5	0,723	1,545	1,548	5,202
6	0,727	1,818	1,818	6,110
Mittelwert:	0,726	1,681	1,681	5,653
	Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %			— 8,9 %
		D.		
1	0,729	1,739	1,735	5,831
2	0,726	1,694	1,701	5,715
3	0,719	1,754	1,770	5,940
4	0,717	1,588	1,601	5,372
5	0,716	1,535	1,556	5,219
6	0,708	1,765	1,811	6,067
Mittelwert:	0,719	1,679	1,700	5,691
	Vergleich mit Versuch C, ausgedrückt in %			+ 0,57 %
	Vergleich mit Versuch A, ausgedrückt in %			— 8,28 %

+ vermehrt, — vermindert.

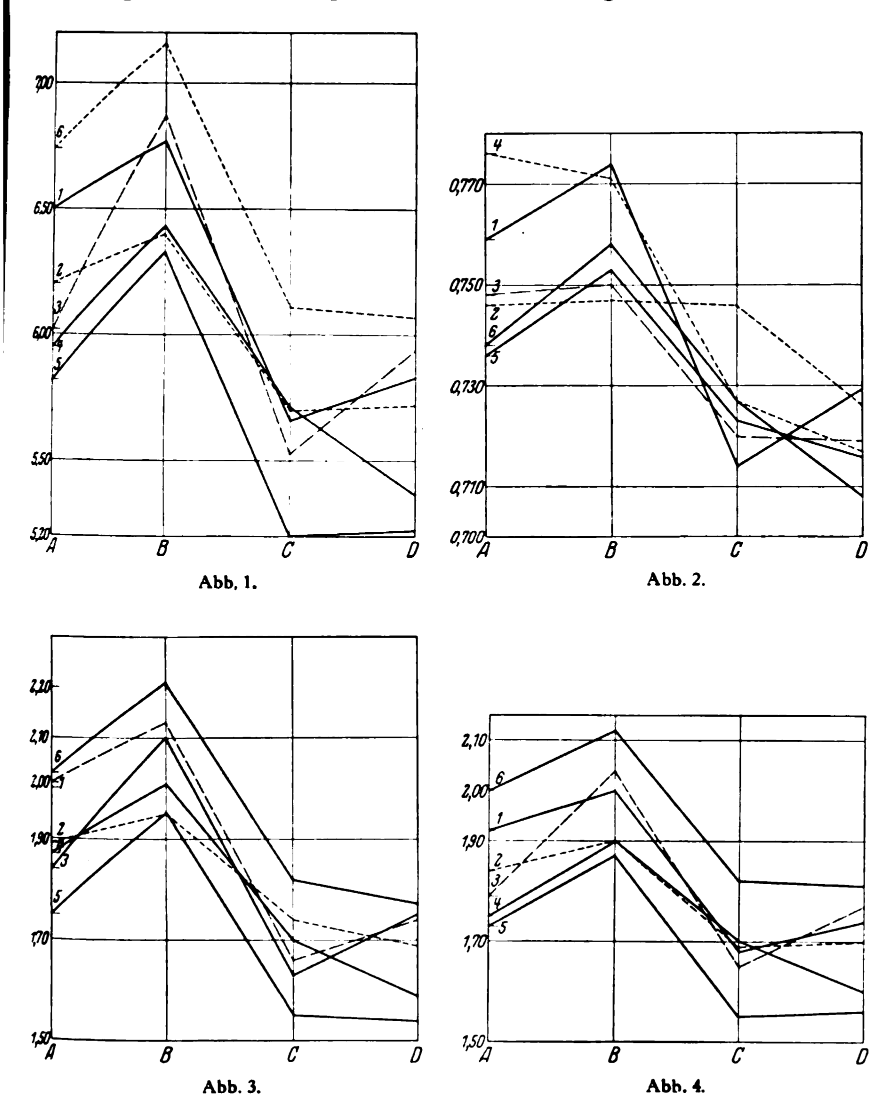


Abb. 1. Abb. 2.

Abb. 3. Abb. 4.

produktion nach Fettzufuhr sogar negativ werden sah. Ich möchte diese Versuche deshalb nicht heranziehen, weil es sich nicht um reine Grundumsatzversuche handelt und weil die Herabsetzung des respiratorischen Quotienten in *Gigons* Versuchen von einer ganz anderen Größenordnung war als in meinen Versuchen.

Wir schreiten jetzt zur Hauptversuchsreihe D, in welcher die spezifisch-dynamische Wirkung von Fleisch auf die im Zustande der Fetternährung befindlichen Tiere geprüft wurde. Aus den sechs Versuchs-

reihen ergab der Durchschnitt der Mittelwerte: für die Kohlensäure 1,679, den Sauerstoffverbrauch 1,700, die Kalorienzahl 5,691, den respiratorischen Quotienten 0,719. Durchschnittlich betrug demnach die Vermehrung gegenüber der Versuchsreihe C nur 0,57 %, was praktisch bedeutet, daß die spezifisch-dynamische Wirkung von Fleisch ausgeblieben ist.

Überblickt man die Mittelwerte bei je einem einzelnen Tier, so ergibt sich das gleiche Bild wie in der Versuchsreihe B, nämlich individuelle Unterschiede in der Größe der spezifisch-dynamischen Wirkung. So hatte Versuchstier 3 eine relativ starke spezifisch-dynamische Wirkung von Fleisch; auch nach Fetternährung bleibt eine solche erhalten, wenn auch viel kleiner. Andererseits ist aber gerade bei den Versuchstieren 4 und 5, wo die spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches bei der normalen Ernährung recht erheblich war, die spezifisch-dynamische Wirkung des Fleisches nach Fettfütterung entweder Null oder sogar negativ.

Um die Bedeutung der Tatsache, daß nach einer ergiebigen Fettfütterung das Fleisch bei den gleichen Tieren, deren Reaktion im Normalzustande auf das Fleisch bekannt ist, keine spezifisch-dynamische Wirkung mehr hervorruft, zu begreifen, bedarf es der Klarlegung der Bedingungen, auf welche es voraussichtlich herauskommen dürfte.

Sicher ist, daß die Leber meiner Ratten in demjenigen Zustande der fettigen Abwandlung ist, welchen *Boehm* beschrieben. Da nun eine Änderung in der Stoffwechselwirkung in den ersten Stunden nach der Fleischaufnahme zur Beobachtung gelangt, wo infolge der Aufnahme von Eiweißabbauprodukten eine mehr oder weniger intensive Steigerung der Lebertätigkeit eintritt, halte ich es für sehr wahrscheinlich, daß die fettig abgewandelte, an Glykogen verarmte Leber nicht mehr des Grades der Lebertätigkeit fähig ist, welcher zu dem führt, was als spezifisch-dynamische Wirkung bezeichnet wird. Ich verkenne nicht, daß demgegenüber eingewendet werden kann, daß die einseitige Speckfütterung im Gesamtorganismus nicht bloß den Zustand der Leber verändere. Hierfür ließe sich anführen, daß der Grundumsatz eine beträchtliche Erniedrigung erfahren habe. Es bleibt daher die Möglichkeit bestehen, daß die Verminderung der spezifisch-dynamischen Wirkung des Fleisches einen allgemeineren Grund habe als die Minderbefähigung der Leber. Aber angesichts der tatsächlichen Veränderung in der Leber und der zeitlichen Verhältnisse halte ich es für berechtigt, die Annahme in den Vordergrund zu stellen, daß eine engere Beziehung zwischen der Änderung in der Leber durch einseitige Fetternährung und der Herabsetzung der spezifisch-dynamischen Wirkung des Fleisches besteht.

Zusammengefaßt sind die Ergebnisse der vorstehenden Arbeit die nachfolgenden:

1. Der Grundumsatz von Ratten wird durch einseitige Speckernährung gegenüber einer gemischten Nahrung erniedrigt.

2. Die spezifisch-dynamische Wirkung von Fleisch, deren Größe an den gleichen Tieren bei gemischter Nahrung festgestellt worden ist, verschwindet nach einseitiger Speckfütterung oder ist ganz erheblich herabgesetzt.

3. Angesichts der Tatsachen, daß nachweislich die Leber in eine Fettleber umgewandelt worden ist, und mit Rücksicht auf die zeitlichen Verhältnisse kann die Aufhebung der spezifisch-dynamischen Wirkung möglicherweise als Äußerung einer geänderten Leberfunktion betrachtet werden.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 106.

Der Einfluß der Thymusdrüse auf die Empfindlichkeit gegen Sauerstoffmangel mit besonderer Berücksichtigung des Atmungszentrums.

Von

Hans Stämpfli.

(Aus dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern.)

(Eingegangen am 28. März 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Die Empfindlichkeit kleiner Tiere, speziell von Ratten, gegen Sauerstoffmangel ist von *L. Asher* und seinen Mitarbeitern zu einer Methode ausgearbeitet worden, um die Schilddrüsenfunktion und die Wertigkeit von Schilddrüsenpräparaten zu untersuchen. Diese Methode eignet sich auch zur Untersuchung anderer Drüsenfunktionen als die der Schilddrüse, sowie der Wechselbeziehungen anderer Drüsen zur Schilddrüse. Sie hat sich zur klinischen Untersuchung der Schilddrüsenfunktion bewährt.

Was die Spezifität der Methode mit Rücksicht auf die Schilddrüse betrifft, so haben dieselbe *Okushima* in einer unveröffentlichten Arbeit und *Wagner* in einer Dissertation (Bern) nachgewiesen. *Wagner* verfütterte oder injizierte an Ratten und Meerschweinchen Drüsenextrakte der Thyreoidea, der Thymus und der Milz. Dabei fand er:

1. Bei Verabreichung von Schilddrüsenextrakt war die Empfindlichkeit gegen Sauerstoffmangel erheblich gesteigert, sowohl bei Ratten als auch bei Meerschweinchen. 2. Versuche mit Milz ergaben keine wesentliche Veränderung gegenüber Normaltieren. Einzelne Tiere

waren etwas resistenter. 3. Versuche mit Thymus zeigten keine Veränderungen gegenüber Normaltieren. 4. Versuche mit Thymus plus Schilddrüse zeigten Steigerung der Empfindlichkeit. *Wagner* nimmt an, daß es sich hierbei nur um die Wirkung von Schilddrüse allein handle, weil Thymus allein nicht wirke. 5. *Wagner* faßt deshalb die erhöhte Empfindlichkeit gegen Sauerstoffmangel als spezifische Wirkung erhöhter Schilddrüsenfunktion auf.

Unbeschadet der Spezifität der Reaktion der Schilddrüsenfunktion läßt sich diese Methode, wie schon angedeutet, dazu benutzen, um zu untersuchen, inwieweit andere Drüsen mit innerer Sekretion mit der Schilddrüse in Beziehung stehen, in dem von der Methode geprüften Funktionsgebiet. Solche Untersuchungen sind von *Streuli* gemacht worden, der aus seinen Ergebnissen auf eine relativ hemmende Beziehung zwischen Schilddrüse und Milz schloß. Seither haben eine ganze Reihe von anderen Arbeiten mit anderen Methoden die Richtigkeit seines Schlusses bewiesen. Was die Thymus anbetrifft, so ist ihre Beziehung zur Schilddrüse noch nicht mit dieser Methode geprüft worden. *Newton* hat mit einer ganz anderen Methode die gegenseitig fördernde Wirkung streng bewiesen.

Im Hinblick auf das bisher Entwickelte folgte ich der Anregung von Prof. *Asher*, um erstens nochmals das Verhalten von milzlosen Tieren, andererseits von schilddrüsen- und thymuslosen Tieren gegen Sauerstoffmangel zu untersuchen.

Entsprechend diesem Gedanken war die Aufgabe dieser Arbeit, die Empfindlichkeit milzloser und schilddrüsenloser Tiere mit der Empfindlichkeit der Normaltiere gegen Sauerstoffmangel zu vergleichen. Ferner die Empfindlichkeit normaler Tiere mit derjenigen von schilddrüsen- und thymuslosen Tieren gegen Sauerstoffmangel festzustellen. Zu diesen Untersuchungen verwendete ich nicht wie meine Vorgänger, abgesehen von *Wagner*, Ratten, sondern Meerschweinchen. Der Grund hierfür ist, daß Meerschweinchen nach Entmilzung nicht wie Ratten anämisch werden, was *Scheinfinkel* nachgewiesen hat. Zweitens ist die Entfernung der Thymus beim Meerschweinchen immerhin leichter als bei der Ratte.

Methodik.

Die Versuchsanordnung ist folgende:

Der Sauerstoffmangel wird durch Unterdruck erzeugt. An die Wasserleitung angeschlossen ist die Wasserstrahlluftpumpe. Das Saugrohr ist durch einen Dreiweghahn einerseits mit dem Rezipienten und andererseits mit dem Barometer und dem Luftregulierungshahn verbunden. Der Rezipient besteht aus einer geräumigen Glasglocke. Diese ist am Rande plan geschliffen und liegt einer ebenfalls plangeschliffenen Glasplatte auf.

Oben in der Glasglocke befindet sich eine Öffnung, die mit einem Kautschukpfropfen geschlossen wird. Durch den Pfropfen führt ein Thermometer durch das Innere des Rezipienten; so kann die Temperatur unter der Glasglocke gemessen werden.

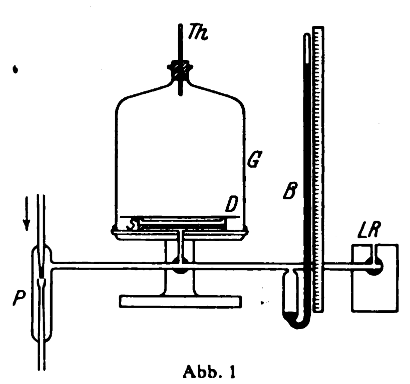


Abb. 1

P = Wasserstrahlpumpe. *G* = Glasglocke. *Th* = Thermometer. *D* = Drahtgitter. *S* = Schale mit Kalilauge. *B* = Barometer. *LR* = Luftregulierungshahn.

Das zwischen dem Rezipienten und dem Luftregulierungshahn eingeschaltete Barometer gestattet die direkte Ablesung des unter der Glocke herrschenden Luftdrucks. Mit dem Luftregulierungshahn kann die Menge der einströmenden Luft genau dosiert werden. Dies ist von Bedeutung, weil die Luftpumpe immer mehr Luft wegsaugt, als zur Erhaltung des gewünschten Unterdrucks notwendig ist. Man hat es nun durch die Regulierung der nachströmenden Luft in der Hand, den Druck im Rezipienten innerhalb einer gewissen Zeit um das gewünschte Maß zu vermindern oder bis zum atmosphärischen Druck steigen zu lassen.

Auf den Boden des Rezipienten habe ich eine Schale mit Kalilauge gestellt und mit einem Drahtnetz bedeckt. Die Kalilauge resorbiert die von den Versuchstieren ausgeatmete Kohlensäure. Das Drahtnetz ist so groß gewählt, daß die Tiere sich nicht zwischen Schale und Glockenwand drängen können und ihre Beobachtung nicht gehemmt wird.

Zu Beginn des Versuchs wird zuerst die Wasserstrahlpumpe in Betrieb gesetzt. Den Rand der Glasglocke bestreicht man zur guten Abdichtung mit Vaseline, ebenso den Pfropfen. Nachdem die Schale mit frischer Kalilauge beschickt ist, setzt man die Tiere auf das Drahtgitter und bringt die Tiere an Ort und Stelle. Es ist vorteilhaft, der Luft noch einige Augenblicke freien Zutritt zu lassen, damit die Tiere sich vom ersten Schrecken vor der neuen Umgebung erholen können. Der Verschlußpfropfen wird dann eingesetzt und mit der Verdünnung der Luft kann begonnen werden. Zeigen sich nun im Verlauf des Versuchs bei den Tieren bedrohliche Symptome, so muß rasch frische Luft eingelassen werden, sollen die Tiere nicht zugrunde gehen. In dringenden Fällen habe ich hier und da innerhalb $^3/_4$ bis 1 Minute den Druck unter der Glocke von etwa 270 mm Quecksilberdruck auf den atmosphärischen Tagesdruck ansteigen lassen, also um über 400 mm, ohne eine nachteilige Wirkung bei den Tieren feststellen zu können. Anders verhält es sich natürlich mit dem Senken des Druckes. Hier muß man

langsam vorgehen, wenn man nicht durch Gasembolie den Verlust der Tiere riskieren will.

Was beobachtet man an einem normalen Meerschweinchen, das dem zunehmenden Unterdruck ausgesetzt wird? Zunächst ist es natürlich unruhig, läuft umher und macht allerlei Bewegungen, ohne daß diese durch den Unterdruck bedingt sind. Es ist manchmal recht schwierig festzustellen, wo die Erscheinungen der Furcht und des Unbehagens aufhören, und diejenigen anfangen, die durch den Einfluß des Unterdrucks hervorgerufen werden.

Über das weitere Verhalten kann man sich am besten an Hand der graphischen Darstellung der Atmungsfrequenz orientieren. Das Steigen der Kurve bedeutet Zunahme, das Sinken Abnahme der Atmungsfrequenz.

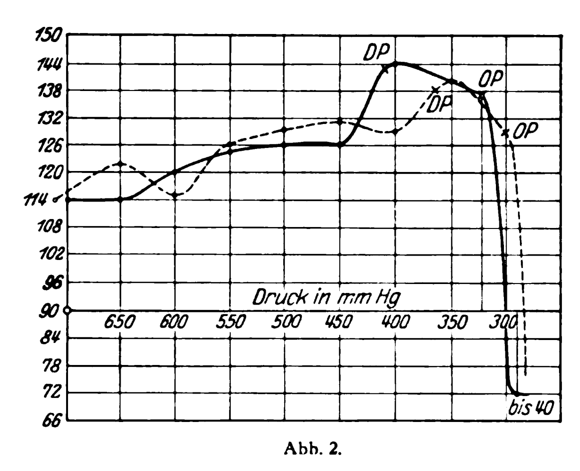


Abb. 2.

Es macht sich also zuerst eine allmähliche Steigerung geltend, die bis zu einem Drucke von etwa 450 mm Hg anhält. Die Kurve verläuft auch bis hier nicht genau geradlinig; wie das Durchschnittsbild zeigt, kommen kleinere Schwankungen vor, die aber nicht wesentlich sind. Nach 450 mm macht sich ein plötzliches Ansteigen geltend bis zum Punkte der maximalen Erhebung, der zwischen 400 bis 350 mm Hg liegt. Diese Höhe wird im allgemeinen bis zu etwa 325 mm eingehalten, worauf die Frequenz äußerst rasch auf ein Minimum heruntergeht. Kurz vor dem Kulminationspunkt der Kurve tritt Dyspnoe ein. Hier bezeichne ich mit Dyspnoe den Zustand der Tiere, in dem sie die Muskulatur willkürlich zur Atmung heranziehen. Die Flanken werden deutlich bewegt, bei jedem Atemzug hebt und senkt sich auch der Kopf ein wenig. Solange nur Dyspnoe vorhanden ist, hält sich die Atemfrequenz auf

der Höhe, nur ein schwaches Sinken macht sich schon bemerkbar. Bald aber tritt Orthopnoe ein; der Zustand, in dem sich die Tiere mit gespreizten Vorderbeinen fest aufstützen, um alle verfügbare Kraft zur Atmung zu verwenden. Der Kopf ist in die Höhe gerichtet, der Mund meist offen. Im nächsten Augenblick schnappen die Tiere nach Luft und fallen um. Die Atmungsfrequenz sinkt rasch. Sofort muß frische Luft zugelassen werden, um die Tiere vor dem Ersticken zu retten.

Die absolute Höhe der Atmungsfrequenz ist nicht bei allen Meerschweinchen gleich. Es spielt neben unbekannten Faktoren besonders das Alter der Tiere eine Rolle. In den oben angeführten Kurven, die der letzten Versuchsreihe entsprechen, waren die Tiere wesentlich jünger und lebhafter und zeigten eine höhere Atmungsfrequenz als in den ersten beiden Reihen. Die absolute Erhöhung bzw. Senkung der Atmungsfrequenz kann also nur innerhalb der einzelnen Versuchsreihen bewertet werden, weil es sich um Tiere gleichen Alters und gleicher Abstammung handelt. Zum Vergleich der verschiedenen Versuchsreihen darf nur die relative Erhöhung bzw. Senkung der Atmungsfrequenz herangezogen werden.

Versuche mit schilddrüsenlosen Tieren.

Operation. Die Narkose wird durch 1½ ccm 2% Mo. hydrochloric. sol. erreicht, subkutan injiziert. Aufbinden der Tiere, Wegschneiden der Haare und Desinfektion des Operationsfeldes mit Jodtinktur. Medianschnitt am Halse, 2 cm lang vom Kehlkopf abwärts. Spaltung der Muskulatur in der Mittellinie mit Pinzette und stumpfer Präpariernadel. Die beiden Lappen der Schilddrüse liegen beim Meerschweinchen beidseitig der Trachea, nicht immer in gleicher Höhe. Bei der Kleinheit des Operationsfeldes muß darauf geachtet werden, daß keine Blutung entsteht. Schon kleine Blutungen stören die Übersicht so stark, daß die Auffindung des Nervus recurrens und dessen schonende Abpräparation von der Drüse erschwert oder unmöglich gemacht wird. Die Schilddrüse wird mit einer stumpfen Pinzette gefaßt und der N. recurrens sorgfältig gelöst. Wenn die Drüse sauber herausgeschält wird und man die Gefäße etwas zusammenklemmt, ist beim Meerschweinchen eine besondere Abbindung nicht nötig. Nach der Wegnahme der Schilddrüse wird alles genau nachgesehen, dann verschlossen. Muskeln, Fascie und Haut werden gesondert genäht (Knopfnaht). Die Umgebung der Naht wird dann nochmals mit Jodtinktur bestrichen und die Wunde mit Kollodium abgeschlossen.

Die *Versuche* wurden nun so angestellt, daß immer ein operiertes Tier mit einem normalen Kontrolltier zusammen unter die Glasglocke kam. Als Kontrolltier wurde ein gleichaltriges Normaltier gewählt, wenn möglich vom gleichen Wurf. Sowohl operierte wie normale Tiere lebten unter den gleichen Bedingungen. Nach der Operation wurden

die noch unter dem Einfluß des Morphiums stehenden Tiere 2 bis 3 Tage isoliert. Die Einzelheiten des Versuchs zeigt das Protokoll. Es seien hier zwei Musterbeispiele aufgeführt.

4. Versuch (31. Mai 1926).

Es wurden verwendet: Schilddrüsenloses Tier, operiert vor 5 Tagen, normales Kontrolltier. Barometerstand des Tages 712,0 mm. Temperatur unter der Glasglocke 19° C. Dauer des Versuchs 23 Minuten.
(AF gleichbedeutend mit Atmungsfrequenz.)

Kontrolltier	Druck	Schilddrüsenloses Tier
Starker Exophthalmus AF 120	665	AF 100
AF 90	540	AF 90
AF 98	500	AF 84
Dyspnoe	340	Dyspnoe, hohe AF (130)
Fällt um, läßt Harn und Kot. Sinken der AF	300	Anhalt. hohe AF, sonst keine Symptome

Unterbrechung des Versuchs.

6. Versuch (4. Juni 1926).

Versuchstiere: Schilddrüsenloses Tier, operiert vor 2 Tagen, normales Kontrolltier. Barometerstand des Tages 712,0 mm. Temperatur unter der Glocke 14° C. Dauer des Versuchs 26 Minuten.
(AF = Atmungsfrequenz.)

Kontrolltier	Druck	Schilddrüsenloses Tier
AF 80	655	AF 66
AF 78	590	AF 64
AF gesteigert . . .	475	AF gesteigert
AF 120	360	Dyspnoe, erholt sich aber wieder
Dyspnoe-Orthopnoe .	300	Orthopnoe, apathisch
Fällt um und bleibt in Seitenlage liegen .	270	

Unterbrechung des Versuchs.

Streuli fand, daß schilddrüsenlose Ratten viel weniger empfindlich gegen Sauerstoffmangel sind als normale gesunde Ratten, und zwar mit der gleichen Versuchsanordnung, die hier angewendet und be-

schrieben wird. Seine schilddrüsenlosen Ratten zeigten bei einem Druck, wo bei Normaltieren schon Orthopnoe eintrat, noch keine Zeichen bemerkbarer Atemnot. Wie aus meinen Protokollen hervorgeht, verhielten sich die Meerschweinchen anders. Bald waren die Tiere etwas mehr, bald etwas weniger empfindlich gegen Sauerstoffmangel als Normaltiere. D. h. die schweren Symptome der Dyspnoe und der Orthopnoe traten durchschnittlich ungefähr zu gleicher Zeit ein. Der einzige Unterschied bestand in der höheren durchschnittlichen Atmungsfrequenz der Normaltiere. Dies bedeutet aber, daß das Atmungszentrum der schilddrüsenlosen Tiere weniger empfindlich gegen Sauerstoffmangel ist. Daß gleichwohl die schweren Symptome gleichzeitig bei schilddrüsenlosen wie bei normalen Tieren eintraten, erkläre ich mir so daß die Wegnahme der Schilddrüse doch den Organismus etwas schwächt. Die niedrigere Atmungsfrequenz ist bei schilddrüsenlosen Tieren noch am deutlichsten bei einem Drucke von 400 mm Hg. Bei tieferem Drucke steigt dann auch bei den operierten Tieren die Atmungsfrequenz. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist also zusammengefaßt folgendes:

Die Empfindlichkeit gegen Sauerstoffmangel wird bei Meerschweinchen durch die Wegnahme der Schilddrüse um weniges vermindert. Die Verminderung ist keinesfalls so deutlich, wie *Streuli* sie an Ratten beobachtete. Das Ergebnis nähert sich eher dem, das *Wagner* bei Verfütterung von Milz erhielt.

Versuche mit entmilzten Meerschweinchen.

Operation. Narkose mit 1½ ccm 2% Mo. hydrochloric. sol., subkutan injiziert. Desinfektion des Operationsfeldes mit Jodtinktur. Hautschnitt vom unteren Rande des Sternums an 2 bis 3 cm abwärts in der Mittellinie.

Zum Öffnen des Peritoneums ging ich folgendermaßen vor: Hochhalten des Peritoneums mit Pinzette, beim unteren Ende des Hautschnittes kleine Inzision. In diese kleine Öffnung wurde ein flaches Instrument eingeschoben, in der Richtung gegen das Sternum. Die Öffnung wurde vollendet, indem man mit dem Messer über das eingeschobene Instrument fuhr. Eine Verletzung der Eingeweide wurde so vermieden. Die Lage der Milz ist beim Meerschweinchen nicht immer gleich, manchmal oberflächlich an der Magenwand, manchmal mehr in der Tiefe, so daß ein größerer Teil des Magens aus der Bauchhöhle herausgehoben werden muß. Die Milz wird mit einer Pinzette gefaßt und luxiert. Zwei bis drei Ligaturen um die in die Milz führenden Gefäße, Abtragung der Milz. Naht des Peritoneums, der Muskulatur und fortlaufende Naht der Haut. Jodanstrich und Kollodiumabschluß. Die Meerschweinchen ertrugen die Operation alle gut. Sie gingen nicht nach einiger Zeit an perniziöser Anämie zugrunde, wie dies verschiedene Autoren bei Ratten beobachtet haben. Die *Versuche* wurden in gleicher Weise angeordnet wie bei schilddrüsenlosen Tieren.

Es seien hier drei Protokolle als Beispiele angeführt.



21. Versuch (28. Juni 1926).

Versuchstiere: Entmilztes Tier, operiert vor 3 Tagen, normales Kontrolltier. Barometerstand des Tages 719,4 mm. Temperatur unter der Glocke 17,7° C. Dauer des Versuchs 25 Minuten. (AF = Atmungsfrequenz.)

Kontrolltiere	Druck	Entmiltztes Tier
AF 102	719	AF 114
AF 100	500	AF 120
	370	Wird unruhig, Bauchlage, hohe AF, Dyspnoe
Dyspnoe	350	
	300	Orthopnoe, große Erschöpfung

Unterbrechung des Versuchs.

Die Erschöpfung hielt beim entmilzten Tiere auch nach der Unterbrechung des Versuchs an. In der darauffolgenden Nacht ging es daran ein.

26. Versuch (16. Juli 1926).

Versuchstiere: Entmilztes Tier 7 Tage nach der Operation, normales Kontrolltier. Barometerstand des Tages 715,3 mm. Temperatur unter der Glocke 22° C. Dauer des Versuchs 22 Minuten. (AF = Atmungsfrequenz.)

Kontrolltier	Druck	Entmilztes Tier
AF 84	715	AF 78
AF 102	600	AF 90
Dyspnoe AF 126	370	Dyspnoe AF 102
AF 120	310	AF 120
Orthopnoe . . .	300	Orthopnoe
	295	Schnappt nach Luft und fällt um in Seitenlage

Unterbrechung des Versuchs.

27. Versuch (19. Juli 1926).

Gleiche Versuchstiere wie im 26. Versuch. Entmilztes Tier 11 Tage nach der Operation. Barometerstand des Tages 714,3 mm. Temperatur unter der Glocke 24° C. Dauer des Versuchs 25 Minuten. (AF = Atmungsfrequenz.)

Kontrolltier	Druck	Entmilzes Tier
AF 78	650	AF 78
AF 84	500	AF 90
AF 102	400	AF 102
Dyspnoe	340	Dyspnoe
	320	Orthopnoe
Orthopnoe	310	Bauchlage
Bauchlage	300	Seitenlage

Unterbrechung des Versuchs.

Die Ergebnisse dieser Reihe können kurz gefaßt werden:

1. Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe mit schilddrüsenlosen Tieren bewirkte die Entmilzung eine Steigerung der Empfindlichkeit gegen Sauerstoffmangel. Nimmt man den Durchschnitt, so war die Steigerung der Empfindlichkeit bei Wegnahme der Milz deutlicher als die Herabsetzung der Empfindlichkeit bei Wegnahme der Schilddrüse.

2. In Übereinstimmung mit der Arbeit *Streulis* traten auch die schweren Symptome der Dyspnoe und der Orthopnoe bei entmilzten Tieren eher auf als bei den Kontrolltieren.

3. Die Atmungsfrequenz war bei den meisten Tieren auch bei normalem Luftdruck etwas erhöht.

4. Die beschriebenen Symptome traten am deutlichsten vom 3. bis zum 5. Tage nach der Operation auf. Sie klangen langsam wieder ab. Vom 11. bis 14. Tage nach der Operation an verhielten sich die entmilzten Tiere ähnlich wie die Normaltiere.

Versuche mit schilddrüsen- und thymuslosen Meerschweinchen.

Operation. Die Wegnahme der Schilddrüse geschah nach der in der ersten Versuchsreihe beschriebenen Methode, gewöhnlich nach der Ausführung der Thymektomie. Bedingung zum Gelingen der Thymektomie ist das Beschaffen von Meerschweinchen im geeigneten Alter. Bei ganz jungen Tieren ist es fraglich, ob sie die Operation überstehen; schon von der achten Woche nach der Geburt an ist die Thymus jedoch in Rückbildung begriffen. Bei gut sich entwickelnden Meerschweinchen dürfte die sechste oder siebente Lebenswoche der geeignetste Zeitpunkt zur Thymektomie sein.

Narkose wie in den anderen beschriebenen Fällen durch 1½ ccm 2% Mo. hydrochloric. sol., subkutan. Hautschnitt mit dem Messer, median vom oberen Rande des Sternums etwa 3 cm nach oben. Das weitere Vorgehen geschieht nur mit stumpfen Instrumenten. Aufsuchen der Trachea, dann Hochheben des Sternums und der Muskulatur mit Haken (durch Assistenten). Man geht dann am besten der Trachea entlang in die Tiefe. Den linken Lappen der Thymus findet man direkt über dem Herzbeutel. Fassen und Luxieren der Thymus mit stumpfer Pinzette. Mit einer zweiten Pinzette löst man nach Möglichkeit die Drüse aus dem umgebenden Gewebe und zieht sie heraus. Meist gelang die Herausnahme nicht in einem Stück. Der Rest wurde dann von der rechten Seite aus abgezupft, das ganze Operationsfeld nachkontrolliert und Fascie und Haut separat zugenäht. Das Operationsfeld liegt in unmittelbarer Nähe der großen zum Herzen führenden Gefäße. Besonders die großen Venen sind sehr empfindlich. Bei Verwendung von scharfen oder spitzen Instrumenten genügt eine kleine Zuckung des Tieres, um eine lebensgefährliche Verletzung hervorzurufen. Aber es gilt hier auch kleinste Blutungen zu vermeiden, wenn die ohnehin dürftige Übersicht über das Operationsgebiet nicht ganz unmöglich gemacht werden soll.

Die Thymektomie wird von den Tieren ertragen, aber sie bedeutet in Verbindung mit der Entnahme der Schilddrüse einen ziemlich schweren Eingriff in den jugendlichen Organismus. Die so operierten Tiere unterscheiden sich bald von den Normaltieren durch Zurückbleiben im Wachstum.

Die Versuchsanordnung blieb die gleiche wie in der vorangehenden Reihe. Protokollbeispiele:

30. Versuch (28. Oktober 1926).

Versuchstiere: Operiertes Tier, Entnahme der Schilddrüse vor 2 Tagen, Entnahme der Thymus vor 4 Tagen. Normales Kontrolltier. Barometerstand des Tages 706,2 mm. Temperatur unter der Glasglocke 20,5° C. Dauer des Versuchs 24 Minuten. (AF = Atmungsfrequenz.)

Kontrolltiere	Druck	Operiertes Tier
AF 120	706	AF 108
AF 132	550	AF 90
AF 144	400	AF 108
Dyspnoe	360	Bauchlage ohne dyspnoetische Erscheinungen
	340	Schläft ein u. geht langsam i. Seitenlage über, Atmung sehr langsam
Keine andern Symptome als starke Dyspnoe .	330	Etwa 60 AF, reagiert nicht mehr auf starken Schall

Unterbrechung des Versuchs.

Erholung bei beiden Tieren ziemlich rasch.

47. Versuch (9. November 1926).

Versuchstiere: Operiertes Tier, Entnahme der Schilddrüse vor 7 Tagen, Entnahme der Thymus vor 14 Tagen. Normales Kontrolltier. Barometerstand des Tages 715,3 mm. Temperatur unter der Glocke 16° C. Dauer des Versuchs 20 Minuten. (AF = Atmungsfrequenz.)

Kontrolltier	Druck	Operiertes Tier
AF 108	715	AF 108
AF 120	650	AF 96
AF 120	600	AF 96
AF 120	550	AF 108
AF 114	500	AF 96
AF 126	450	AF 96, unregelmäßig
AF 132	400	AF 108
AF 144	380	AF 114, Dyspnoe
Dyspnoe	350	Orthopnoe 96—108
Orthopnoe	320	Vorübergehende Gleichgewichtsstörungen
Seitenlage	280	Seitenlage, Rückgang der AF

Unterbrechung des Versuchs.

Bei diesen Versuchen war die Atmungsfrequenz der operierten Tiere deutlich geringer als bei den Kontrolltieren. Besonders auffallend war der Unterschied beim Druck zwischen 600 und 400 mm Hg. Einen guten Überblick über die Versuche geben die beiden graphischen Darstellungen der Atmungsfrequenz. Tafel 3 zeigt den Verlauf eines einzelnen, typischen Versuchs, Tafel 4 den Durchschnitt aus allen Protokollen.

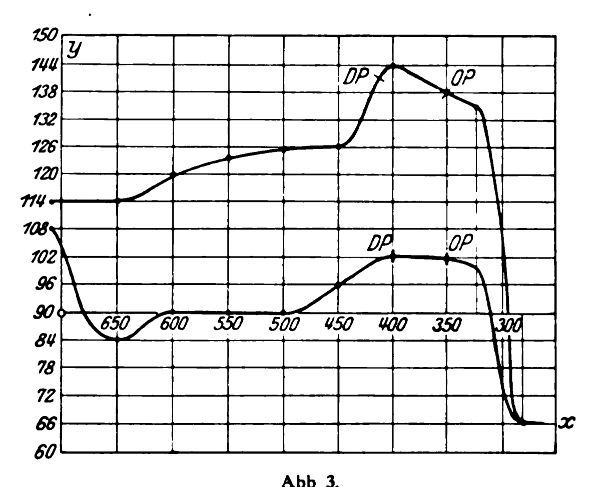


Abb 3.
Untere Kurve = Atmungsfrequenz des schilddrüsen- und thymuslosen Tieres.
Obere Kurve = Atmungsfrequenz des Kontrolltieres.

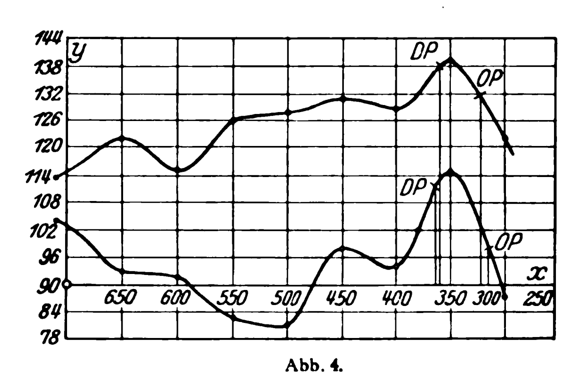


Abb. 4.
Untere Kurve = schilddrüsen- und thymusloses Tier.
Obere Kurve = normales Kontrolltier.

Über den Verlauf der Kurve beim Kontrolltier ist schon näher eingegangen worden. Die Atmungsfrequenz des schilddrüsen- und thymuslosen Tieres zeigte zuerst einen Abfall, der fast immer unter 100 Frequenzen pro Minute herunterging. Dann folgte ein schwaches Ansteigen oder ein Gleichbleiben der Frequenzzahl bis zu einem Drucke von etwa 450 mm. Von diesem Drucke an machte sich dann eine raschere Steigerung bis zum Maximum geltend, ähnlich wie beim Normaltier. Dieses Maximum lag aber immer bedeutend tiefer als das Maximum beim Kontrolltier. Die

Dyspnoe trat bei den operierten Tieren etwas früher auf als bei Normaltieren. Die Orthopnoe und die endgültige Seitenlage hingegen machte sich erst bei etwas tieferem Barometerdruck geltend. Die Unterschiede waren aber unbedeutend.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist also eine sehr ausgeprägte Verminderung der Empfindlichkeit des Atmungszentrums gegen Sauerstoffmangel, sowohl gegenüber dem Normaltier als auch gegenüber dem schilddrüsenlosen Tier. Daraus geht hervor, daß die Thymus zur Schilddrüse auf dem hier geprüften Funktionsgebiet in fördernder Beziehung steht.

Diese Ergebnisse stellen indirekt eine Bestätigung einer Arbeit von *Newton* aus dem physiologischen Institut der Universität Bern dar. *Newton* untersuchte die Empfindlichkeit normaler, schilddrüsenloser und schilddrüsen- und thymusloser Kaninchen bei allmählicher Erwärmung der Atmungsluft innerhalb bestimmter Grenzen (Zimmertemperatur bis 35° C). Er wählte als leicht kontrollierbar zur Feststellung der Empfindlichkeit auch die Atmungsfrequenz und brachte seine Versuchsergebnisse im Durchschnitt ebenfalls in graphische Darstellung. Die so erhaltenen Kurven bei thymus- und schilddrüsenlosen Tieren zeigen eine große Ähnlichkeit mit den von mir bei Sauerstoffmangel erhaltenen. Mit anderen Worten, er stellte fest, daß die Atmungsfrequenz der Tiere bei Entnahme der Schilddrüse herabgesetzt werde, bei Entnahme bei Thymus und Schilddrüse aber noch beträchtlich mehr.

Die Ergebnisse sämtlicher Versuchsreihen

lassen sich in folgende Sätze zusammenfassen:

1. Die *Asher*sche Methode der Prüfung der Empfindlichkeit gegen Sauerstoffmangel wurde an Meerschweinchen angewendet in der Absicht, die etwaige Wechselwirkung zwischen Milz und Schilddrüse und zwischen Thymus und Schilddrüse zu prüfen.

2. Schilddrüsenlose Meerschweinchen zeigten gegen Sauerstoffmangel ein wenig verschiedenes Verhalten gegenüber Normaltieren.

3. Nach Entfernung der Milz wurden die Tiere eine Zeitlang empfindlicher gegen Sauerstoffmangel als Normaltiere. Da Meerschweinchen nach Entmilzung nicht anämisch werden, muß aus dieser Tatsache der Schluß gezogen werden, daß nach Ausfall der Milz die Schilddrüse überwertig wird.

4. Die geschilderte Beobachtung ist ein neuer Beitrag zu der Lehre, daß mit Rücksicht auf die hier beobachtete Funktion Schilddrüse und Milz in antagonistischer Beziehung stehen; das Verschwinden des Überwiegens der Schilddrüse nach einiger Zeit beruht auf der von der Berner Schule nachgewiesenen Kompensation des Milzausfalles.



5. Wird Thymus und Schilddrüse entfernt, so zeigen die Tiere bei Sauerstoffmangel ein auffallend verschiedenes Verhalten gegenüber dem Normaltier. Dasselbe betrifft wesentlich das Atemzentrum, welches bei schilddrüsen- und thymuslosen Tieren sehr viel weniger empfindlich ist, indem die Atmungsfrequenz in viel geringerem Maße steigt.

6. Aus diesem Unterschied geht hervor, daß beim Meerschweinchen Schilddrüse und Thymus auf dem hier beobachteten Funktionsgebiet in fördernder Beziehung stehen, womit ein neuer Anhaltspunkt für die von der Berner Schule vertretene Auffassung der Synergie von Schilddrüse und Thymus gewonnen wird. Zugleich tritt neben dem von *Newton* angewendeten Verfahren das in dieser Arbeit benutzte hinzu, als neue Methode zur quantitativen Prüfung der Änderung der Reaktionsfähigkeit des Zentralnervensystems nach Entfernung von Schilddrüse und Thymus.

Literatur.

M. Duran, diese Zeitschr. **106**, 254, 1920. — *H. Nakao*, ebendaselbst **178**, 384, 1926. — *F. C. Newton*, Amer. Journ. of Physiol. **71**, 1924. — *E. Ruchti*, diese Zeitschr. **105**, 1, 1920. — *H. Wagner*, Untersuchungen über die Spezifität der *Asher*schen Methode der Prüfung der Schilddrüsenfunktion durch Sauerstoffmangel, Dissertation, Bern. — *H. Streuli*, diese Zeitschr. **87**, 359, 1918.

Keimungsphysiologische Studien unter Hervorhebung des Lichtkeimungsproblems.

Von

Anneliese Niethammer.

(Aus dem elektrotechnischen und botanischen Institut der deutschen technischen Hochschule in Prag.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der deutschen Gesellschaft zur Förderung der Künste und Wissenschaften in Böhmen.)

(Eingegangen am 30. März 1927.)

Es ist heute eine allgemein bekannte Tatsache, daß der Keimungsverlauf der verschiedensten Samen im Laboratorium durch Licht wesentlich begünstigt, ja oft erst ermöglicht wird. Desgleichen weiß man, daß dieser Lichteinfluß von verschiedenen äußeren Faktoren, wie Temperatur, Substrat und eventuell auch Alter des Samens abhängig ist. Bei Temperaturen, die wesentlich über 20° liegen (1), verschwindet meistens das ausgesprochene Lichtbedürfnis der Samen. Man hat deshalb bei einschlägigen Versuchen stets eine Temperatur von ungefähr 19 bis 20° gewählt, die noch die volle Lichtempfindlichkeit des Samens erkennen läßt. Fügt man dem Substrat bestimmte Säuren, Nitrate und Enzyme zu, so verschwindet desgleichen die ausgesprochene Lichtempfindlichkeit (2). Ebenso wird erwähnt, daß das Alter und der Reifegrad der Samen für die Lichtempfindlichkeit von Bedeutung ist.

Bei Anordnung der hier mitgeteilten Versuche interessierten mich vor allem zwei Momente.

1. Läßt sich das Lichtbedürfnis der sogenannten Lichtkeimer vielleicht durch die Standortsverhältnisse, unter denen sie gewachsen und gereift sind, erklären, und wie verhalten sich verschiedene Samen und Früchte des gleichen Standortes bezüglich ihres Lichtbedürfnisses.

2. Sind die Lichtkeimer tatsächlich unmittelbar nach der Ernte ausgesprochen lichtempfindlicher, als wenn sie eine geraume Zeit abgelegen sind.

Über diese beiden Punkte finden sich einige Angaben in der Literatur. *Kinzel* erwähnt, daß man für die Lichtempfindlichkeit primär die Standortsverhältnisse verantwortlich machen könne (3). Daß der Reifegrad und das Alter der Samen die Lichtempfindlichkeit umgekehrt proportional beeinflussen, wird von *Lehmann* (l. c.) hervorgehoben.

Eine genaue und einigermaßen systematische Arbeit über die beiden hier aufgerollten Probleme fehlt noch und es scheint demnach nicht überflüssig, zu diesem Problem beizutragen.

Bevor auf eine Besprechung der Versuchsergebnisse eingegangen wird, ist zu erwähnen, daß zunächst bekannte, lichtempfindliche Samen gesammelt und untersucht wurden. Im Anschluß daran wurde auch Material herangezogen, das bezüglich seiner Lichtempfindlichkeit noch nicht geprüft worden war.

An den Kopf der Versuchsprotokolle wird eine Tabelle gesetzt, die uns darüber Auskunft gibt, welche Samen und Früchte unmittelbar nach der Ernte *überhaupt* nicht, weder im Licht, noch im Dunkeln zu keimen vermögen. Viele Proben konnten auch bei ihrem zweiten Auflegen, d. h. 3 bis 4 Monate nach erfolgter Ernte nicht zum Keimen gebracht werden, auch über diese Verhältnisse gibt die Tabelle Auskunft.

Die Versuchsanordnung erfolgte in nachstehender Weise. Als *Lichtquelle* diente natürlich nur elektrisches Lampenlicht, da Tageslicht viel zu inkonstant ist. Es wurden 200 HK Nitralampen verwendet. Die Samen wurden in Petrischalen auf qualitativem Filterpapier zum Keimen ausgelegt. Die Abdunkelung der Dunkelserien erfolgte durch schwarzes Photographenpapier, das zur Vermeidung überflüssiger Erwärmung mit weißem bedeckt wurde. Die Schalen wurden auf einem Tische angeordnet, über dem die elektrische Lampe, die von einem Reflektor umrahmt war, hing. Diese ganze Aufstellung erfolgte in einem Dunkelzimmer, des elektrotechnischen Instituts, in welchem die Temperatur sehr konstant war. Im Mittel betrug sie 19° mit ungefähr 1° Abweichung nach oben und unten. Während der kühlen Jahreszeit wurde mittels Gasheizung die Temperatur entsprechend reguliert.

Tabellarische Zusammenstellung der geprüften Samen, die eine Ruhezeit durchmachen müssen.

Die Zusammenstellung zeigt, daß die Zahl der Samen, die erst eine kürzere oder längere Ruhezeit durchmachen muß, größer ist, als man im allgemeinen glaubt.

Das keimungsphysiologische Verhalten einer ganzen Reihe von Samen ist unmittelbar nach der Ernte überhaupt nicht zu studieren, da sie erst eine kürzere oder längere Ruheperiode durchmachen müssen. Im folgenden wollen wir nun an einigen Beispielen die Fragen 1 und 2 beantworten.

Es wird Material sehr verschiedener Provinienz geprüft.

Erntejahr 1926.

Familie	Vertreter	Erntedatum	Serie I Keimungen	Beginn	Schluß	Serie II Keimungen	Beginn	Schluß
Geraniaceen	Ger. pratense	13. VIII.	0	15. VIII.	20. X.	20 %	14. XI.	14. I.
Umbelliferen	Aegop. podagr.	20. VIII.	0	20. VIII.	20. X.	0	21. X.	2. III.
	Anthriscus silv.	22. VI.	0	1. VIII.	16. IX.	0	19. X.	20. III.
	Chaeroph. aur.	18. VIII.	0	20. VIII.	16. IX.	0	20. X.	3. III.
	Pastinacia sativa	18. VIII.	0	20. VIII.	16. IX.	0	20. X.	3. III.
Caryophyllaceen	Viscaria vis.	1. VIII.	0	13. VIII.	16. IX.	100 %	19. X.	11. X.
Saxifragaceen	Saxifraga caes.	29. VI.	0	1. VII.	16. IX.	20 %	27. X.	27. XI.
Papaveraceen	Chelidon. majus	23. VI.	0	1. VII.	26. IX.	50 %	28. X.	2. XI.
Cistaceen	Helianthemum canum	2. VIII.	0	13. VIII.	16. IX.	20 %	20. X.	20. XI.
Kruziferen	Capsella B. P.	21. VI.	0	1. VII.	16. IX.	0	20. X.	2. III.
	Alyssum mont.	30. V.	0	1. VII.	16. IX.	60 %	20. X.	1. I.
	Alyssum sax.	3. VI.	0	1. VII.	16. IX.	50 %	20. X.	20. I.
Kompositen	Carduus nutans	13. VIII.	0	15. VIII.	16. IX.	0	20. X.	20. III.
	Gemeine Kamille	29. VII.	0	1. VIII.	16. IX.	35 %	20. X.	20. XI.
Campanulaceen	Campanula rap.	20. VIII.	0	21. VIII.	20. X.	0	21. X.	2. III.
Papilionaceen	Astragalus glyc.	13. VIII.	0	15. VIII.	16. IX.	0	20. X.	2. III.
	Robinia ps.	20. XII.	0	21. XII.	20. III.			
	Laburnum vulg.	16. VIII.	0	20. X.	20. III.			
Aristolochiaceen	Aserum Eur.	2. VI.	0	1. VII.	16. IX.	0	20. X.	20. III.
Scrophulariaceen	Verbascum phlom.	30. VIII.	0	10. X.	20. III.			

Probe I, Salvia pratensis. Erntedatum: 3. Juni 1926. Felsabhang bei Rostock, kein Baumwuchs, kein Unterholz.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt $L:D$[1]) = 70 : 25
2. 4 Monate nach der Ernte . . . . . . $L:D$ = 70 : 50

Von demselben Standort wurde am gleichen Tage Alyssum saxatile geerntet und in der gleichen Weise zur Keimung ausgelegt. Keimverlauf siehe später.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt . 0 Keimungen
2. 4 Monate nach der Ernte aufgelegt . . . $L:D$ = 50 : 80

Diese beiden Proben des gleichen Standorts zeigen also, was die Lichtempfindlichkeit anbelangt, kein übereinstimmendes Verhalten.

Probe II von Salvia pratensis. Erntedatum: 29. Juni 1926. Sehr sonniger Felsabhang ohne Baumwuchs bei Srbsko.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt = $L:D$ = 50 : 15
2. 4 Monate nach der Ernte . . . . . . = $L:D$ = 50 : 50

Hier wurde abermals vom gleichen Standort Alyssum saxatile geerntet und in der gleichen Weise aufgelegt.

1. Gleich nach der Ernte aufgelegt . . . 0 Keimungen,
2. 4 Monate nach der Ernte aufgelegt . . $L:D$ = 40 : 80.

Das Verhalten ist wieder das gleiche wie bei I.

Probe III von Salvia pratensis. Erntedatum: 21. Juli. Felsabhang ohne Baumwuchs bei Kuchelbad.

1. Unmittelbar nach der Ernte . . . . . $L:D$ = 70 : 30,
2. 4 Monate nach der Ernte . . . . . . $L:D$ = 70 : 60.

Von dem gleichen Standort und gleichen Erntedatums wurde geprüft Helianthemum canum.

1. Unmittelbar nach der Ernte . . . . . $L:D$ = 30 : 30
2. 4 Monate nach der Ernte . . . . . . $L:D$ = 30 : 30

Weiterhin wurde von demselben Standort noch unter gleichen Bedingungen Sanguis orba officinalis geprüft.

1. Unmittelbar nach der Ernte . . . . . $L:D$ = 20 : 0,
2. 4 Monate nach der Ernte . . . . . . $L:D$ = 70 : 40.

Probe IV von Salvia pratensis. Erntedatum: 21. Juni. Eisgrub, sehr sonnige Berglehne.

1. Unmittelbar nach der Ernte . . . . . $L:D$ = 80 : 40
2. 4 Monate nach der Ernte . . . . . . $L:D$ = 70 : 60

Die hier mitgeteilten Versuche an Salvia pratensis lassen tatsächlich erkennen, daß mit zunehmendem Alter die Lichtempfindlichkeit viel geringer wird. Die vier geprüften Proben zeigen in dieser Hinsicht ein sehr übereinstimmendes Verhalten.

Der völlig unbeschattete, sehr steinige Standort wird zunächst bei Salvia tatsächlich durch die Lichtempfindlichkeit gerechtfertigt. Später

---

[1]) L = Keimprozente im Lichte, D = Keimprozente im Dunkeln.

stimmt allerdings diese Relation nicht mehr, da die Lichtempfindlichkeit sehr stark abnimmt.

Interessant ist das Ergebnis über das Verhalten des verschiedenen Samenmaterials vom gleichen Standort. Bezüglich ihrer Lichtempfindlichkeit verhalten sich die hier geprüften Proben sehr unterschiedlich.

Im Anschluß an die Salvia pratensis wird Salvia verticillata, die von *Kinzel* als Lichtkeimer beschrieben wird, behandelt.

Salvia verticillata. Erntedatum: 13. August 1926. Sonnige Sandgrube bei Enzowan.

1. Unmittelbar nach der Ernte . . . . . . $L:D = 20:0$
2. 6 Monate nach der Ernte . . . . $L:D = 30:0$

Von dem gleichen Standort wird Salvia silvestris geprüft.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt . $L:D = 20:\ 0$
2. 6 Monate nach der Ernte aufgelegt . . $L:D = 45:25$

Ebendaselbst geerntet Tragopogon pratensis.

1. Unmittelbar nach der Ernte . . . . $L:D = 30:\ 0$,
2. 4 Monate nach der Ernte . . . . . . $L:D = 80:70$.

Es zeigen abermals die drei Vertreter des gleichen Standortes keimungsphysiologisch nicht das gleiche Verhalten.

Saxifraga caespitosa. Nach *Kinzel* (l. c.) ein typischer Lichtkeimer, wie die meisten Saxifragaceen. Erntedatum 29. Juni 1926 Srbsko. Sehr sonnige Steinlehne.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt keimt das Material überhaupt nicht. 3 Monate nach der Ernte ergab die Prüfung unbedingte Lichtempfindlichkeit. 7 Monate nach der Ernte keimt bereits ein erheblicher Prozentsatz auch im Dunkeln.

Von dem gleichen Standort wurde an demselben Standort *Silene nutans* geerntet. Unmittelbar nach der Ernte ist das Material ebenfalls obligater Lichtkeimer. 4 Monate nach der Ernte verläuft der Keimungsverlauf im Licht und im Dunkeln gleich gut.

Eine Sonderstellung nimmt vorläufig *Epilobium parviflorum* ein. Erntedatum 13. August 1926. Straßengraben bei Enzowan. Keine sehr besonnte Stelle. Es wurden vier Proben ausgelegt, und zwar unmittelbar nach der Ernte, dann 2, 4 und 6 Monate nach der Ernte. Der Keimungsverlauf war immer obligat an die Lichtanwesenheit gebunden.

Epilobium angustifolium, das von einer ausgesprochen besonnten Waldlichtung geerntet wurde, erwies sich nur unmittelbar nach der Ernte durch Licht wesentlich gefördert (es traten aber auch im Dunkeln Keimungen auf), 6 Monate nach der Ernte keimt licht und dunkel gleich gut. Eine zweite Probe derselben Samen, die Anfang September in Talheim (Österreich) auf einer besonnten Waldlichtung geerntet wurde, keimte 3 Monate nach der Ernte nur im Licht, 6 Monate nach der Ernte im Licht und Dunkeln gleich gut.

Von demselben Standort wie Epilobium angustifolium I wurde am gleichen Tage *Astragalus ciceri* geerntet.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt $L:D = 50:\ 0$
2. 5 Monate nach der Ernte aufgelegt . . $L:D = 60:60$

Rumex acetosella. Erntedatum am 1. August 1926. Straßengraben bei Dĕtenice. 1. Keimung streng an Licht gebunden. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt. 2. Keimung wieder streng an Licht gebunden. 5 Monate nach der Ernte aufgelegt.

Interessant ist, daß eine andere Probe von Rumex ac., die am 2. August ebenfalls in einem Straßengraben bei Srbsko geerntet wurde, weder in 1., noch in 2. eine einzige Keimung erzielt.

Bupleurum longifolium zeigte ein ganz besonders interessantes Verhalten und muß daher eigens hervorgehoben werden. Erntedatum am 2. August 1926 in Laubwald bei Srbsko.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt $L:D = 50:0$
2. 5 Monate nach der Ernte aufgelegt . . $L:D = 0:90$

Von demselben Standort wurde an demselben Tage *Viscaria viscosa* geerntet.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt 0 Keimungen
2. 5 Monate nach der Ernte aufgelegt . $L:D = 100:90$

Alsine setacia. Ernte am 22. Juli. Sehr steiler, sonniger Felsabhang bei Rostock.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt . 0 Keimungen
2. 2 Monate nach der Ernte aufgelegt . . $L:D = 30:0$
3. 6 ,, ,, ,, ,, ,, . . $L:D = 80:90$

Apium graveoelens. Ernte am 10. September 1926 im Institutsgarten.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt . 0 Keimungen
2. 3 Monate nach der Ernte aufgelegt . . $L:D = 30:0$
3. 6 ,, ,, ,, ,, ,, . . $L:D = 60:0$

Asperula cynanchica. Erntedatum am 2. August 1926. Sehr besonnte Steinlehne bei Srbsko.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt . $L:D = 20:60$
2. 4 Monate nach der Ernte aufgelegt . . . $L:D = 20:80$

Von dem gleichen Standort wurde an demselben Tage *Helianthemum obscurum* geerntet.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt . . $L:D = 50:10$
2. 4 Monate nach der Ernte aufgelegt . . . $L:D = 50:20$

Ebenfalls von demselben Standort wurde am gleichen Tage *Helianthemum canum* geerntet.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt $L:D = 100:100$
2. 4 Monate nach der Ernte aufgelegt . $L:D = 80:100$

Campanula patula. Erntedatum am 29. Juli 1926. Sandufer an der Elbe bei Čelakovice[1]).

1. Obligater Lichtkeimer. Hoher Keimprozent,
2. Keimung im Licht und im Dunkeln gleich gut.

Am 29. Juli werden Hundskamille und Bromus sterilis von dem gleichen Standort geerntet. Schutthalde bei Čelakovice.

[1]) 1 bedeutet gleich nach der Ernte aufgelegt, 2 nach 5 Monaten, 3 nach 7 Monaten nach der Ernte aufgelegt.

Kamille.

1. Unmittelbar nach der Ernte 0 Keimungen,
2. 3 Monate nach der Ernte im Lichte wesentlich begünstigt.
3. 6 Monate nach der Ernte Keimungsverlauf im Licht und im Dunkeln gleich gut.

Bromus sterilis.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt 0 Keimungen.
2. 4 Monate nach der Ernte aufgelegt Keimung im Licht und im Dunkeln gleich gut, hoher Prozentsatz.

Alyssum montanum. Erntedatum am 30. Mai 1926. Felsabhang mit sehr geringem Humusbelag. Standort läßt unbedingt auf einen Lichtkeimer schließen.

1. Unmittelbar nach der Ernte . . . . . 0 Keimungen
2. 4 Monate nach der Ernte . . . . . . $L:D = 10:95$

Melandryum rubrum. Erntedatum am 29. Juni. Standort sehr feuchter, schattiger Garten in Tetschen-Liebwerd. Standort ließe auf einen ausgeprägten Dunkelkeimer schließen.

1. Unmittelbar nach der Ernte wird die Keimung durch die Dunkelheit begünstigt,
2. 6 Monate nach der Ernte Keimungsverlauf im Licht und im Dunkeln gleich gut.

Erigeron canadensis. Erntedatum am 29. Juni 1926. Schutthaufen bei Čelakovice. Von *Kinzel* (l. c.) als Lichtkeimer beschrieben.

1. Keimungsverlauf unmittelbar nach der Ernte im Licht und im Dunkeln 90%,
2. 3 Monate nach der Ernte und
3. 6 Monate nach der Ernte zeigen das gleiche Verhalten.

Es soll nun noch ein Beispiel verschiedenen Materials von dem gleichen Standort angeführt werden. Erntedatum 13. August 1926. Wiese bei einem Bahndamm.

Echium vulgare.

1. Unmittelbar nach der Ernte . . . . $L:D = 25:\ 0$
2. 4 Monate nach der Ernte . . . . . $L:D = 30:20$

Silene vulgaris.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt $L:D = 10:80$
2. 4 Monate nach der Ernte aufgelegt . $L:D = 10:80$

Knautia ochroleuca.

1. Unmittelbar nach der Ernte aufgelegt $L:D = 30:15$
2. 4 Monate nach der Ernte aufgelegt . $L:D = 40:40$

Carduus nutans.

Weder bei 1 noch 2 ist eine einzige Keimung zu erzielen.

Es muß am Schluß der Versuchsprotokolle noch ein Wort zur Versuchsdauer angegeben werden. Sie betrug bei jedem Versuch 2 bis 3 Monate. Um etwaigen Einwendungen gleich vorweg zu begegnen, sei nochmals betont, daß die Temperatur 19° C betrug, mit nämlich 1° Abweichung nach oben und unten.

Zusammenfassung.

Die Lichtempfindlichkeit der hier geprüften Samen nimmt mit zunehmendem Alter in auffälliger Weise ab. Unsere Versuche stellen also eine weitgehende Bestätigung und Ergänzung der Angaben von *Lehmann* (l. c.) und *Kinzel* (l. c.) dar.

Bei folgenden Versuchsobjekten, die unmittelbar nach der Ernte stark lichtempfindlich sind, konnte festgestellt werden, daß die Lichtempfindlichkeit mit zunehmendem Alter schwindet: Salvia pratensis, Salvia silvestris, Saxifraga caespitosa, Epilobium angustifolium, Beupleurum long. Alsine setacia, Helianthemum canum, Echium vulgare, Silene nutans, Campanula patula, Hundskamille.

Eine Reihe der geprüften Objekte zeigt auch bei fortgeschrittenem Alter noch volle Lichtempfindlichkeit, das sind: Salvia vert., Epilobium parv., Rumex ac., und Apium graveolens.

Diese *abnehmende* Lichtempfindlichkeit vieler Samen und Früchte muß entschieden besonders hervorgehoben werden. Es ist jedenfalls sehr leicht möglich, daß in der Natur, wenn der normal abgelegene Samen zur Keimung kommt, überhaupt *keine Lichtempfindlichkeit* mehr herrscht. Es lassen sich dafür folgende Argumente anführen:

1. Das Lichtbedürfnis nimmt im allgemeinen mit dem Alter des Samen so rasch und in so starkem Maße ab, daß in der Natur, wenn der Samen zur Keimung gelangt, er infolge seines Alters meist schon die Lichtempfindlichkeit verloren hat. Es soll hier nochmals auf das Beispiel von Bupleurum long. hingewiesen werden. Unmittelbar nach der Ernte, also in nicht nachgereiftem Zustande, benötigen die Körner zum Auskeimen unbedingt des Lichtes. Später tritt gerade der umgekehrte Fall ein, indem die abgelagerten Samen nur im Dunkeln keimen.

2. Es ist bekannt, daß bei sehr vielen Samen der Lichteinfluß durch bestimmte Agenzien ersetzbar ist. Vor allen wirken Säuren, Nitrate und verschiedene Enzyme in diesem Sinne. Die Temperatur ist auch für die Lichtempfindlichkeit von Bedeutung, vor allem wirkt der Temperaturwechsel als Lichtersatz. Man kann sich nun vorstellen, daß von den hier angeführten Faktoren einer oder mehrere in der Natur wirken und so auch der Lichteinfluß überflüssig wird. Übrigens ist es sehr leicht möglich, daß noch eine ganze Reihe anderer, noch nicht geprüfter Agenzien lichtersetzend wirken kann und so einige Aus-

nahmefälle, für die kein geeignetes Lichtersatzmittel bekannt ist, verschwinden werden.

Apium graveolens, Epilobium parviflorum und Rumex acetosella zeigen auch in stark überlagertem Zustande noch die volle Lichtempfindlichkeit. Desgleichen ist bei Epilobium parviflorum der Lichtersatz schwierig. In einer früheren Abhandlung konnte ich zeigen, daß nur das Warmbad in diesem Sinne positiv wirkt (4). Allerdings kann man bei diesen Ausnahmen zunächst die oben angeführte Erklärungsmöglichkeit annehmen. Außerdem läßt sich noch ein zweiter Grund aufführen. Weiterhin kann zwischen den hier als „obligate Lichtkeimer“ befundenen Samen und den ruhenden Samen ein Zusammenhang bestehen. Vielleicht verlieren die hier geprüften Samen bei längerem Lagern, womöglich erst im zweiten Jahre, auch ihr Lichtbedürfnis. Man könnte dabei beim Lichtkeimen an ähnliche Vorgänge wie im ruhenden Samen denken. Das Licht wirkt hier erweckend ein. In der Natur ist es sehr leicht möglich, daß die Samen ein oder vielleicht zwei Jahre überlagern müssen, da hier der Lichteinfluß sich nicht geltend machen kann.

Vorläufig wollen wir diese Fälle noch unter die sogenannten „obligaten Lichtkeimer“ rechnen, aber mit dem Vorbehalt einer Änderung.

Die Standorte, auf denen diese sogenannten strengen Lichtkeimer gewachsen sind, sprechen auch nicht gerade für eine natürliche Lichtempfindlichkeit, Epilobium parviflorum ist in einem Straßengraben unterhalb starken Unterholzes geerntet. Im Vergleich damit müßte Saxifraga caespitosa viel eher ein strenger Lichtkeimer sein. Rumex stammt von einem ganz ähnlichen Standort, wie Epilobium. Am allerwenigsten kann ich mir bei Apium graveolens eine natürliche Lichtempfindlichkeit vorstellen. Es ist mir keineswegs bekannt, daß im gärtnerischen Betrieb auf diese Eigentümlichkeit Rücksicht genommen wird.

In zweiter Linie wollen wir noch zusammenhängend auf die Standortsverhältnisse eingehen. Man kann sich entschieden in der Natur die Lichtkeimung nur auf bestimmten Standorten vorstellen. In erster Linie ist meiner Ansicht nach dabei an sehr kalte, wuchslose Felsabhänge zu denken. Nach dieser Auffassung müßte beispielsweise Alyssum montanum, das auf ausgesprochen felsigem, schattenlosem, humusarmem Untergrund gewachsen ist, Lichtkeimer sein. Die Erfahrung lehrt nun gerade das Gegenteil. Das gleiche gilt für Saxifraga caespitosa, die auf einem ähnlichen Standort gereift ist. Ebensowenig erwiesen sich Epilobium angustifolium und Alsine setacia als strenge Lichtkeimer.

Umgekehrt ist es auch bekannt, daß es Dunkelkeimer gibt. Wir konnten leider keinen solchen ausfindig machen. Dem Standort nach hätte man annehmen müssen, daß Melandryum rubrum Dunkelkeimer ist. Die erste Probe wird durch Dunkelheit begünstigt, die zweite keimt bereits im Licht und im Dunkeln gleich gut.

Interessant ist auch, daß bei den Laboratoriumsversuchen die Vertreter eines Standorts, trotz gleichen Erntedatums und ganz gleicher Versuchsbedingungen ein unterschiedliches Verhalten zeigten.

Macht man sich die hier entwickelten Anschauungen zu eigen, so kann man annehmen, daß die meisten Lichtkeimer nichts von der Natur Gewolltes sind, sondern wenn man so sagen darf, ein *Kunstprodukt* unserer Laboratoriumsverhältnisse. Das Licht müßte demnach im Laboratoriumsversuch etwas ersetzen, was in der Natur nach dem Abliegen des Samenmaterials normalerweise schon vorhanden ist. Damit komme ich allerdings zur ganz entgegengesetzten Auffassung vom Lichtkeimungsproblem, wie meine Vorgänger. Dem Lichteinfluß könnte man hier eine Reizwirkung zuschreiben, so daß man ihn ohne weiteres unter die Stimulantia zählen kann. Wenn man noch auf die *Gassner*schen Gedankengänge eingehen will, die annehmen, daß bei den Lichtkeimern die Ausbildung einer Hemmungsschicht im Dunkeln erfolgt (l. c.), so möchte ich da hinzufügen, daß es vielleicht wahrscheinlicher ist, daß primär schon so eine Hemmungsschicht vorhanden ist und dieselbe erst durch das Licht in irgend einer Form beseitigt wird. Um wieder auf die Verhältnisse in der Natur zurückzukommen, so kann man denken, daß diese Hemmungsschicht nach dem Ablagern bereits verschwunden ist, ebenso bei den etwas abgelagerten Samenproben bei den Laboratoriumsversuchen. Man kann sich aber auch vorstellen, daß während der Nachreifezeit im Samen bestimmte chemische Umwandlungen vor sich gehen müssen, die beispielsweise im noch nicht abgelegenen Samen durch Licht beschleunigt werden können. Eine Auffassung, die sich sehr gut mit den Ansichten von *Lehmann* und von *Ottenwälder* deckt (l. c.).

Auf diese Weise komme ich, wie schon erwähnt, zu einer ganz anderen Auffassung als meine Vorgänger, die den Lichteinfluß stets als das Primäre, von der Natur Bestimmte hielten. Nach meiner Auffassung ist die Lichtwirkung als Reiz aufzufassen, damit kommt das Licht auch unter die Stimulatoren.

Somit bestünde dann auch zwischen den Winterknospen und den sogenannten Lichtkeimern ein Unterschied. Bei ersteren habe ich mich in einer früheren Publikation dahin ausgesprochen, daß es nicht unmöglich ist, daß die Knospen von Natur aus lichtempfindlich sind. Hier zeigt sich nun der umgekehrte Fall (5).

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die Lichtempfindlichkeit der geprüften Samen und Früchte nimmt mit zunehmendem Alter in auffallender Weise ab.

2. Zwischen dem Standort, auf dem der Samen reifte, und der Lichtempfindlichkeit besteht kein Zusammenhang. Desgleichen verhalten sich Samenproben gleichen Standortes bezüglich ihrer Lichtempfindlichkeit verschieden.

3. Wird auf Grund des eigenen und fremden Tatsachenmaterials der Gedanke ausgesprochen, daß in der Natur wahrscheinlich keine derartige Lichtempfindlichkeit herrscht.

Literatur.

1) *E. Lehmann*, Zeitschr. f. Bot. **4**, 465, 1912. — 2) *Derselbe*, diese Zeitschr. **50**, 388 1913; *Lehmann* und *Ottenwälder*, Zeitschr. f. Bot. **5**, 337, 1913; *Ottenwälder*, ebendaselbst **6**, 785, 1914; *G. Gassner*, ebendaselbst **7**, 609, 1915. — 3) *W. Kinzel*, Licht und Frost als die Keimung beeinflussende Agenzien, Ulmer Verlag-Stuttgart 1913. — 4) *A. Niethammer* (im Druck). — 5) *Dieselbe*, diese Zeitschr. **177**, 418, 1926.

Über die Darstellung und die Eigenschaften pflanzlicher Perhydridase.

Von

D. Michlin.

(Aus dem Biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit in Moskau.)

(Eingegangen am 30. März 1927.)

In ihren Arbeiten zur Kenntnis des *Schardinger*-Enzyms haben *Sbarsky* und *Michlin* (1) eine Methode der Darstellung und Reinigung der Oxydoredukase der Milch (Perhydridase, Aldehydrase, Xanthinoxydase) beschrieben. Weiterhin haben *Bach* und *Nikolajew* (2) mittels des auf solche Weise isolierten Ferments in Abwesenheit von Sauerstoff und ohne Zusatz anderweitiger Wasserstoffakzeptoren Salicylaldehyd zu Salicylsäure oxydiert. *Bach* und *Michlin* (3) erzielten mittels des gereinigten Ferments unter den gleichen Bedingungen die Oxydation von Purinbasen (Xanthin, Hypoxanthin) zu Harnsäure. Dabei stellte sich heraus, daß die Anwesenheit von freiem Sauerstoff auf den Oxydoreduktionsvorgang sogar eine gewisse Hemmungswirkung ausübt.

Es erschien von Interesse, zu ermitteln, ob die beim Studium der Fermente animalischer Herkunft verwendeten Darstellungs- und Untersuchungsmethoden auch auf die pflanzliche Oxydoredukase übertragen werden können.

Darstellung des Ferments.

Bach (4) konnte 1913 aus Kartoffeln einen wässerigen Extrakt herstellen, der reichlich Perhydridase enthielt und Nitrate zu Nitriten reduzierte. An der Luft wird ein solcher Extrakt aber rasch inaktiviert. Um ihn vor der schädigenden Luftwirkung zu schützen, schlägt *Bach* vor, ihn in gefüllten Fläschchen unter Wasser aufzubewahren.

Ich stellte mir die Aufgabe, beständigere und reinere Präparate des oxydoreduzierenden Ferments aus Kartoffeln zu gewinnen, und gelangte zu folgendem Verfahren.

1 kg geschälter und gewaschener Kartoffeln wird sorgfältig zerkleinert und der Kartoffelbrei rasch in ein 1 Liter destilliertes Wasser enthaltendes Gefäß übertragen. An der Luft wird der Kartoffelbrei braun; unter Wasser geht diese Verfärbung langsamer vor sich.

Das Gemisch wird 2 bis 3 Stunden lang im Schüttelapparat geschüttelt und alsdann in einen hohen Meßzylinder gegossen. Nachdem sich die gröberen Teilchen zu Boden gesetzt haben, wird die trübe Flüssigkeit dekantiert. Der Bodensatz wird in einem mit Verbandgaze ausgekleideten *Buchner*schen Trichter abgenutscht und die abgesogene Flüssigkeit zur dekantierten gegossen. Die ganze bräunlich gefärbte Flüssigkeit wird mit dem 2fachen Volumen Aceton gefällt. Bei der Fällung wird die Flüssigkeit kräftig mit einem Glasstab umgerührt, um einen feinen verteilten Niederschlag zu erhalten. Nach ½ Stunde ist die Fällung abgeschlossen und die klare Flüssigkeit wird dekantiert. Der Niederschlag wird auf einen Buchnertrichter gebracht und der Rest der Flüssigkeit durch Filterpapier abgenutscht; der Niederschlag wird auf der Nutsche zwei- bis dreimal mit wasserfreiem Aceton gewaschen. Das nahezu trockene Pulver wird zwischen Filterpapier abgepreßt und unter Petroleumäther aufbewahrt. Ausbeute bis 25 g. Unter Petroleumäther bleibt die Wirksamkeit des Trockenpräparats dauernd intakt. Zum Gebrauch wird es aus dem Äther genommen und zwischen Filterpapier abgepreßt, bis der Äthergeruch verschwunden ist. Trockene Kartoffelperhydridase ist in Wasser wenig löslich und wird als wässerige Suspension verwendet. Eine solche Suspension wird etwa aus 1 g Fermentpulver und 5 ccm Wasser hergestellt. Als Maß der Aktivität dient die durch die Wirkung der Suspension gebildete Menge Nitrit.

Versuch 1.

1 ccm Suspension + 1 ccm Pufferlösung ($p_H = 7{,}8$) + 1 ccm Natriumnitratlösung (20%) + 0,2 ccm Acetaldehyd (10%)	0,0245 mg N_2O_3
Kontrollversuch mit gekochter Suspension . . .	0,0011 „ N_2O_3

Das Bestimmungsverfahren ist dasselbe wie für die Milchperhydridase. Das Gemisch wird auf ½ Stunde bis 65° C ins Wasserbad gestellt. Dann wird 1 ccm gesättigter Lösung von basischem Bleiacetat zugesetzt, die Flüssigkeit in ein kalibriertes Probierröhrchen filtriert und zum Filtrat das gleiche Volumen *Ilosvay-Lunge*sches Reagens zugesetzt. Die entstandene Nitritmenge, die dem Fermentgehalt proportional ist, wird kolorimetrisch bestimmt.

An Stelle von Acetaldehyd können auch andere Aldehyde verwendet werden, z. B. Glycerinaldehyd, Crotonaldehyd oder Salicylaldehyd, Benzaldehyd usw.

Wird das Trockenpulver mit Wasser bearbeitet und abzentrifugiert, so geht nur ein unbedeutender Teil des Ferments in Lösung über. Merklich höher ist die Löslichkeit in verdünnten Säuren.

10 g des trockenen, von Petroleumäther befreiten Pulvers werden in der Reibeschale mit 50 ccm Salzsäure (n/300) verrieben und das Gemisch 24 Stunden bei Zimmertemperatur unter einer dicken Schicht Toluol stehengelassen. Alsdann wird zentrifugiert. Die klare, gelbliche Lösung enthält 50 bis 60 % der aktiven Substanz des Trockenpräparats. Die Lösung reagiert sauer, kann aber leicht durch Zusatz des gleichen Volumens alkalischer Pufferlösung neutralisiert werden.

Versuch 2.

1 ccm Fermentlösung + 1 ccm Phosphatpuffer (p_H = 7,8) + Natriumnitratlösung (20 %) + 0,2 ccm Acetaldehyd (10 %) . . . . 0,0138 mg N_2O_3
Kontrollversuch mit gekochter Lösung 0

An Stelle von Aldehyd kann auch Hefekochsaft gebraucht werden, der durch Kochen und Filtrieren autolysierter Hefe hergestellt wird.

Versuch 3.

1 ccm Fermentlösung + 1 ccm Pufferlösung (p_H = 7,8) + 1 ccm Hefekochsaft + 1 ccm Natriumnitrat (20 %) . . . . 0,0126 mg N_2O_3
Kontrollversuch mit gekochter Fermentlösung . 0

Die Wirkung des Ferments in Gegenwart von Hefesaft kann durch Vorhandensein von Aldehyden im gekochten Autolysat erklärt werden.

Eigenschaften des Ferments.

Bekanntlich gehören die durch Oxydoreduktionsfermente katalysierten Reaktionen zu den gekoppelten Reaktionen: ein Molekül Substrat wird letzten Endes oxydiert, ein anderes Molekül desselben oder eines anderen Substrats wird reduziert. Deswegen können wir, wo zwei verschiedene Substrate vorhanden sind, das eine als Wasserstoffakzeptor und das andere als Sauerstoffakzeptor betrachten. Wenn das Ferment auf ein einheitliches Substrat wirkt, so kommt es zu einer Art Dismutation desselben: das eine Molekül des Substrats wird zum Wasserstoffakzeptor, während das andere als Sauerstoffakzeptor fungiert, wie es bei der *Cannizzaro*schen Reaktion des Aldehyds stattfindet.

Beim Studium des Wirkungsmechanismus der Kartoffelperhydridase hat *Bach* (4) als erster eine wichtige Eigentümlichkeit bemerkt. Nachdem er festgestellt hatte, daß bei der Wirkung von Oxydoredukasen animalischer Herkunft (aus Milch oder Leberextrakt) auf Nitrate

Eiweißabbauprodukte als Coferment dienen können, wurde er darauf aufmerksam, daß diese Reaktion mit Kartoffelperhydridase vollständig ausbleibt. Später wurde bewiesen [*Morgan*, *Stewart* und *Hopkins* (5)], daß bei der Wirkung des Oxydoreduktionsferments der Milch auch Purinbasen (Xanthin, Hypoxanthin) als Sauerstoffakzeptoren dienen können. Die von *Sbarsky* und *Michlin* dargestellte Oxydoredukase aus Milch reduziert ebenfalls in Gegenwart von Xanthin und Hypoxanthin energisch Nitrate zu Nitriten, wobei die Purinbasen zu Harnsäure oxydiert werden. Es war interessant, zu ermitteln, wie sich das isolierte pflanzliche Ferment den Purinbasen gegenüber verhält.

Die Lösung von Purinbasen wurde auf folgende Weise hergestellt: 10 mg Xanthin oder Hypoxanthin wurden in 3 ccm Natronlauge (0,2 n) gelöst und zur Lösung nach und nach saure Phosphatlösung bis p_H 7,8 zugesetzt; dann wurde mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt. Da das Xanthin bei der Neutralisierung zum Teil ausfällt und eine leichte Trübung verursacht, so ist das bedeutend leichter lösliche Hypoxanthin vorzuziehen.

Folgender Versuch bringt den Vergleich zwischen der Wirkung der Perhydridase aus Milch und aus Kartoffeln auf die Purinbasen.

Versuch 4.

0,1 ccm Milchperhydridase + 1 ccm Pufferlösung ($p_H = 7,8$) + 2 ccm Hypoxanthinlösung + 1 ccm Natriumnitratlösung (16%)	0,0193 mg N_2O_3
1 ccm Kartoffelperhydridaselösung + 1 ccm Pufferlösung ($p_H = 7,8$) + 2 ccm Hypoxanthinlösung + 1 ccm Natriumnitrat (20%)	0

Kontrollproben mit gekochter Perhydridase aus Milch, sowohl als aus Kartoffeln enthalten kein Nitrit.

Auf solche Weise stellte sich heraus, daß die Kartoffelperhydridase im Gegensatz zur Milchperhydridase keine Wirkung auf die Purinbasen ausübt. Dasselbe ist auch von *Dixon* und *Thurlow* (6) beobachtet worden. Werden dagegen die Purinbasen durch irgend einen Aldehyd ersetzt, so geht die Nitratreduktion sehr energisch vor sich.

Ein weiterer Unterschied zwischen der Kartoffelperhydridase und dem animalischen Ferment betrifft ihr Verhalten gegenüber dem Methylenblau. *A. Bach* (7) stellte fest, daß die Oxydoredukase tierischer Herkunft (aus Milch oder Leber) in Gegenwart von Aldehyden oder Eiweißabbauprodukten ebenso energisch Nitrate zu Nitriten, als auch Methylenblau zur farblosen Leucobase reduziert. Da unsere salzsaure Lösung von Kartoffelperhydridase in ihrem Verhalten gegenüber Nitraten in Gegenwart von Aldehyden in keiner Hinsicht von der animalischen Perhydridase abwich, war es natürlich, auch gegenüber

dem Methylenblau analoges Verhalten zu erwarten. Jedoch erwies sich, wie aus nachstehenden Versuchen ersichtlich, die Kartoffelperhydridase gegenüber dem Methylenblau als völlig unwirksam, obwohl sie eine starke Aktivität gegenüber Nitrat besaß. Die Methylenblauversuche wurden in ausgepumpten oder mit Wasserstoff gefüllten Probierröhrchen ausgeführt, da die Reduktion durch Sauerstoff gehemmt wird.

Zuerst wurde die Aktivität des Ferments gegenüber Natriumnitrat bestimmt.

Versuch 5.

0,1 ccm Milchperhydridase + 0,9 ccm Wasser + 1,0 ccm Puffer (p_H = 7,8) + 0,5 ccm Acetaldehyd (10%) + 1 ccm $NaNO_3$-Lösung . . .	0,0210 mg N_2O_3
1,0 ccm Kartoffelperhydridase + 1 ccm Puffer (p_H = 7,8) + 0,5 ccm Acetaldehyd (10%) + 1 ccm $NaNO_3$-Lösung	0,0245 „ N_2O_3

Die Kontrollproben mit gekochten Fermenten enthalten kein Nitrit.

Die Aktivität der Kartoffelperhydridaselösung ist etwa neunmal geringer als die des Milchferments. Deshalb wurde zu den Vergleichsversuchen mit Methylenblau ein großer Überschuß des Ferments verwendet, und zwar 4,5 ccm der Lösung. Diese Menge Fermentlösung bildet ebensoviel Nitrit wie 0,5 ccm Milchperhydridase. Von letzterer wurde dagegen, wie im vorangehenden Versuch, 0,1 ccm verwendet.

Versuch 6.

0,1 ccm Milchperhydridase + 4,4 ccm Wasser + 4 ccm Pufferlösung (p_H = 7,8) + 0,5 ccm Acetaldehyd + 0,2 ccm Methylenblaulösung (1 : 1000): 1 Minute 20 Sekunden Entfärbungszeit.

4,5 ccm Kartoffelperhydridase + 4 ccm Puffer (p_H = 7,8) + 0,5 ccm Acetaldehyd (10%) + 0,2 ccm Methylenblaulösung (1 : 1000): nach 3 Stunden nicht entfärbt.

In Anbetracht der von *Bach* (7) geäußerten Meinung, daß die scheinbare Spezifität der Fermente vom jeweiligen Wirkungsmilieu abhänge, fügte ich zur Kartoffelperhydridase gekochte Milchperhydridase hinzu. Für die Kartoffelperhydridase wurde auf solche Weise hinsichtlich des Gehalts an Neutralsalzen und anderen Begleitstoffen ein Milieu hergestellt, daß den Wirkungsbedingungen der Milchperhydridase möglichst nahe steht. Das Methylenblau wurde jedoch auch in diesem Falle nicht entfärbt.

Es wäre denkbar, daß die Wirkung der Kartoffelperhydridase auf Hypoxanthin in Gegenwart von Nitrat, so wie auf Methylenblau in Gegenwart von Aldehyd oder von Hypoxanthin, durch die Wirkung der zugleich mit der Perhydridase in die Lösung übergehenden Kartoffel-

oxydase (Peroxydase + Oxygenase) maskiert wird. Die Wirkung von Peroxydase auf Milchperhydridase wurde durch einige Vorversuche erforscht. Es stellte sich heraus, daß die Wirkung der Milchperhydridase auf Methylenblau sowohl als auf Nitrat durch Zusatz von Peroxydase in keiner Weise beeinflußt wird.

Zum Studium der Wirkung von Oxydase, d. h. von Peroxydase + Oxygenase, wurde zur Milchperhydridase Kartoffelextrakt zugesetzt.

Versuch 7.

0,1 ccm Milchperhydridase + 1 ccm Puffer (p_H = 7,8) + 1 ccm Hypoxanthinlösung + 1 ccm Nitratlösung + 1 ccm Kartoffelextrakt	0,0245 mg N_2O_3
0,1 ccm Milchperhydridase + 1 ccm Pufferlösung (p_H = 7,8) + 1 ccm Hypoxanthinlösung + 1 ccm Nitratlösung + 1 ccm Wasser	0,0242 „ N_2O_3

Kartoffelextrakt übt folglich auf die Reduktion von Nitrat in Gegenwart von Hypoxanthin durch Milchperhydridase keinen Einfluß aus. Desgleichen konnte keine hemmende Wirkung auf die Entfärbung von Methylenblau durch Milchperhydridase festgestellt werden.

Ist die Oxydoredukase der Kartoffeln mit dem Ferment der Milch identisch?

Beim vergleichenden Studium der Oxydoreduktionsfermente aus Milch und Kartoffeln ergibt sich, daß sie bald die gleichen, bald verschiedene Wirkungen ausüben. *Haas* und *Hill* (8) haben die Vermutung geäußert, daß die Reduktion von Nitrat durch Kartoffelsaft keine Fermentreaktion ist, sondern durch eine besondere Substanz bewirkt wird, die die Autoren „atit“ genannt haben. Die Existenz einer solchen thermobilen, spezifisch reduzierenden Substanz ist aber keineswegs bewiesen und kann auch durch keine Analogie gestützt werden.

Andererseits konnten wir nachweisen, daß unsere durch Wasserextraktion, Acetonfällung und nachträgliche Extraktion mit Salzsäure erhaltene Lösung eine der charakteristischsten Eigenschaften der Fermente aufweist, und zwar die Inaktivierung durch Kochen. Die fermentative Natur der Nitratreduktion durch unser Trockenpräparat sowie durch die Lösung steht außer jedem Zweifel. Ebenso unzweifelhaft erscheint die Deutung des Vorgangs als Oxydoreduktion, wie sie von *Abelous* (9) vorgeschlagen und von *A. Bach* bestätigt wurde. Das Ferment ohne Aldehyd, ebenso wie der Aldehyd allein, sind dem Nitrat gegenüber praktisch wirkungslos. Im System: Kartoffelperhydridase + Aldehyd + Nitrat entstehen, infolge von Wasserspaltung, Reduktionsprodukte des Nitrats einerseits, und zugleich Oxydationsprodukte des Aldehyds andererseits. Nur in diesem System scheint aber die pflanzliche Oxydoredukase ähnlich der animalischen zu wirken. Die für Milchperhydridase

charakteristische Wirkung auf Xanthin und Hypoxanthin, welche zu Harnsäure oxydiert werden, bleibt, wie wir nachweisen konnten, bei der Kartoffeloxydoredukase aus. Der Kartoffelhydridase fehlt auch die für Oxydoredukase tierischer Abstammung nicht minder charakteristische Fähigkeit, Methylenblau in Gegenwart von Purinbasen oder Aldehyden zu reduzieren. Wir müssen daher annehmen, daß in der Kartoffel ein Oxydoreduktionsferment vorhanden ist, das seinem Wesen nach von der Oxydoredukase animalischer Herkunft verschieden ist.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur Herstellung eines Trockenpräparats der Kartoffelperhydridase beschrieben. Die Kartoffelmasse wird mit dem gleichen Volumen Wasser extrahiert, der Extrakt wird mit dem doppelten Velumen Aceton versetzt, der entstandene Niederschlag mit Aceton getrocknet und unter Petroläther aufbewahrt.

Das Präparat ist in n/300 HCl gut lösbar mit schwach gelber Farbe. In Gegenwart von Aldehyden oder Hefekochsaft reduziert es energisch Nitrate zu Nitriten. Es reagiert gar nicht mit Purinbasen und reduziert Methylenblau weder mit Aldehyden, noch mit Purinbasen.

Es wird die Frage über Identität des Schardingerenzyms und der Kartoffelperhydridase diskutiert.

Literatur.

1) *B. Sbarsky* und *D. Michlin*, diese Zeitschr. **155**, 486, 1925; **174**, 116, 1926. — 2) *A. Bach* und *K. Nikolajew*, ebendaselbst **169**, 116, 1926. — 3) *A. Bach* und *D. Michlin*, Ber. **60**, 82, 1927. — 4) *A. Bach*, diese Zeitschr. **52**, 412, 1913. — 5) *Morgon, Stewart* und *Hopkins*, Proc. Roy. Soc. **94**, 109, 1922. — 6) *Dixon* und *Thurlow*, Biochem. Journ. **18**, 971. — 7) *A. Bach*, diese Zeitschr. **31**, 443, 1911; **38**, 154, 1912. — 8) *Derselbe*, Arch. d. scien. physiques et naturelles **132**, 307, 1917. — 9) *Haas* und *Hill*, Biochem. Journ. **17**, 601, 1923. — 10) *Abelous*, C. r. **138**, 1619, 1904.

Über den Abbau der Diacetsäure in der Niere.

Von

I. Snapper und **A. Grünbaum.**

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Universität Amsterdam.)

(Eingegangen am 30. März 1927.)

In vorigen Abhandlungen haben wir mitgeteilt, daß die Ketokörper bei der Leberdurchströmung oxydiert bzw. reduziert werden, d. h. Diacetsäure wird zu β-Oxybuttersäure reduziert, β-Oxybuttersäure zu Diacetsäure oxydiert. Bei dieser Durchströmung der Leber verschwanden aber nur verhältnismäßig kleine Mengen der zugesetzten Ketokörper, auch wenn die Durchströmung tadellos verlief bei niedrigem Blutdruck und schneller Blutströmung (1).

In scharfem Gegensatz hierzu steht das Resultat, das wir in schon früher veröffentlichten Versuchen erhalten hatten, wo bei der Durchströmung der Niere mit β-Oxybuttersäure ein großer Teil der zugesetzten β-Oxybuttersäure verschwand, ohne daß gleichzeitig ein Entstehen von Diacetsäure nachgewiesen werden konnte (2). Hierbei wäre zuzugeben, daß bei den Versuchen der Nierendurchströmung mit β-oxybuttersäurehaltigem Blute die Analysen nur nach der unmodifizierten *van Slyke*schen Methode ausgeführt waren, während bei den Leberdurchströmungen für die Analysen der Ketokörper eine kompliziertere, aber bessere, früher von uns angegebene Methode benutzt wurde (3). Wir haben aber die unkomplizierte *van Slyke*sche Methode der Ketokörperbestimmung bei den Nierendurchströmungen benutzt, weil die Niere ein Organ ist, das keine oder nur winzige Spuren Glykogen enthält: die analytischen Schwierigkeiten mit Hinsicht auf die β-Oxybuttersäurebestimmung, welche bei der Analyse von Leber und Muskeln bestehen, können bei den Nierenversuchen also nicht störend wirken. Um aber jeden Zweifel zu beseitigen, haben wir das Resultat der Nierendurchströmungen mit β-Oxybuttersäure auch mit den verbesserten Methoden

der Ketokörperbestimmungen geprüft und haben unsere früheren Resultate nur bestätigen können.

Vergleichenderweise kann man sagen, daß eine Schafsniere, die 90 bis 100 g wiegt, bei der Durchströmung mit ungefähr 500 mg β-Oxybuttersäure im Mittel 50% verschwinden läßt, ohne daß eine Diacetsäurebildung auftritt. Bei der Durchströmung der viel schwereren Hundeleber (250 bis 300 g) werden von den zugesetzten 400 mg β-Oxybuttersäure ungefähr 20 bis 30% zu Diacetsäure umgesetzt, aber fast alle übrige β-Oxybuttersäure wird unverändert in Blut und Leber zurückgefunden. Weil die Niere der β-Oxybuttersäure gegenüber also stärker abbauend wirkt als die Leber, lag auf der Hand, zu untersuchen, ob die Niere auch Diacetsäure zu vernichten imstande ist. *Embden* und *Michaud* haben angegeben, daß, wenn Nierenbrei mit Blut und Diacetsäure vermischt wird, Diacetsäure verschwindet (4). *Von Lagermark* hat nachher beobachtet, daß Nierenbrei Diacetsäure zu β-Oxybuttersäure reduzieren kann, und wies hierdurch nach, daß nicht nur die Leber, sondern auch die Niere eine sogenannte Ketoreduktase enthält (5). Hierbei muß berücksichtigt werden, daß er, nachdem der Nierenbrei während 5 Stunden mit Diacetsäure digeriert war, nur kleine Mengen β-Oxybuttersäure fand, die er durch die Linksdrehung der gereinigten Gewebsextrakte bestimmte. Während nun *Embden* und *Michaud* ebenso wie *von Lagermark* Leber und Niere in ihrer Wirkung auf die Diacetsäure auf eine Linie stellten, lehren unsere Versuche, daß in dieser Hinsicht Leber und Niere *absolut verschiedene Wirkung* besitzen.

Wir haben Hunde- und Schafsnieren mit Hunde- bzw. Schafsblut, dem Diacetsäure zugesetzt war, durchströmt. Die Durchströmungen geschahen im *Embden*schen Apparat. Der Druck wechselte zwischen 16 und 28 cm Hg, die Durchströmungsschnelligkeit zwischen 50 und 150 ccm pro Minute. Im allgemeinen wurde während der 1½ stündigen Durchströmung das Blut 12- bis 18mal durch die Niere geführt. Die Flüssigkeit, die aus dem Ureter tropfte, wurde immer wieder zum Durchströmungsblut zugesetzt. Damit die Durchströmung gelingt, dürfen nicht mehr als 600 bis 700 mg Diacetsäure pro Liter Blut zugesetzt werden. Versucht man noch mehr Diacetsäure zum Blute zuzusetzen, dann gelingt die Durchströmung oft nicht: vielleicht wird die Niere dann von der zu hohen Konzentration der Diacetsäure vergiftet. Die Analysen der Ketokörper des Durchströmungsblutes und der Nierensubstanz geschahen in diesen Versuchen alle mit den von uns angegebenen Methoden.

Bei der Betrachtung der Tabelle I ergibt sich gleich, daß in der Niere ein sehr beträchtlicher Abbau der Diacetsäure stattfindet, ohne daß größere Mengen Diacetsäure zu β-Oxybuttersäure reduziert werden.

Tabelle 1.

Blutmenge		Nierengewicht		Blut vor Durchströmung		Blut nach Durchströmung		Niere nach Durchströmung		
vor	nach	vor	nach	Aceton + Diacetsäure	β-Oxybuttersäure	Aceton + Diacetsäure	β-Oxybuttersäure	Aceton + Diacetsäure	β-Oxybuttersäure	
Durchströmung		Durchströmung								
ccm	ccm	g	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg	
625	537	112	200	198	18,3	34,3	10,5	6,2	23,1	2 Hundenieren
800	715	95	180	323	55,5	46,6	68	5,2	22,4	Schafsniere
900	817	105	188	270	49	33,5	43	4,2	11,4	"
850	744	78	184	382	55	79	90	8,6	35	"
685	655	92	122	287	31	103	28	6,8	31,5	2 Hundenieren, Durchströmung langsam
900	785	85	200	300	57	53	78	10	22,8	Schafsniere

In dieser Tabelle sind die Diacetsäurewerte als Milligramm-Aceton angegeben.

Die Niere hat also offenbar einen vollständig anderen Einfluß auf die Diacetsäure als die Leber.

Bei der Beurteilung der Bilanzen dieser Untersuchungen muß man wieder bedenken, daß 15 % der Diacetsäure bei der Durchströmung im *Embden*schen Apparat verloren gehen, ohne daß die Einwirkung des Organs hierbei in Frage kommt (6). Wenn man diese Verluste berücksichtigt, sehen die Bilanzen der Versuche wie folgt aus:

Aus der Tabelle II ergibt sich folgendes:

Im ersten Versuch werden von 177 mg Diacetsäure nach der Durchströmung 58,5 mg in Blut und Niere zurückgefunden (5 % als β-Oxybuttersäure).

Im zweiten Versuch werden von 299 mg Diacetsäure nach der Durchströmung 97,8 mg in Blut und Niere zurückgefunden (6 % als β-Oxybuttersäure).

Im dritten Versuch werden von 252 mg Diacetsäure nach der Durchblutung 67 mg in Blut und Niere zurückgefunden (1 % als β-Oxybuttersäure).

Im vierten Versuch werden von 349 mg Diacetsäure nach der Durchblutung 155,6 mg in Blut und Niere zurückgefunden (11 % als β-Oxybuttersäure).

Im fünften Versuch werden nach langsamer Durchströmung von 268 mg Diacetsäure 142,3 mg in Blut und Niere zurückgefunden (6 % als β-Oxybuttersäure).

Im sechsten Versuch werden von 281 mg Diacetsäure nach der Durchblutung 118 mg in Blut und Niere zurückgefunden (8 % als β-Oxybuttersäure).

Tabelle II.

	Vor Durchströmung				Nach Durchströmung			
I.	Blut: Diacetsäure		198 mg	Als mg Aceton angegeben	Blut: Diacetsäure		34,3 mg	Als mg Aceton angegeben
	β-Oxybuttersäure	18 mg =	10 „		β-Oxybuttersäure	10,5 mg =	6 „	
			208 mg		Niere: Diacetsäure		6,2 „	
		15% =	31 „		β-Oxybuttersäure	23,1 mg =	12 „	
			177 mg				58,5 mg	
II.	Blut: Diacetsäure		323 mg	Als mg Aceton angegeben	Blut: Diacetsäure		46,6 mg	Als mg Aceton angegeben
	β-Oxybuttersäure	55,5 mg =	29 „		β-Oxybuttersäure	68 mg =	35 „	
			352 mg		Niere: Diacetsäure		5,2 „	
		15% =	53 „		β-Oxybuttersäure	22,4 mg =	13 „	
			299 mg				97,8 „	
III.	Blut: Diacetsäure		270 mg	Als mg Aceton angegeben	Blut: Diacetsäure		33,5 mg	Als mg Aceton angegeben
	β-Oxybuttersäure	49 mg =	27 „		β-Oxybuttersäure	43 mg =	23 „	
			297 mg		Niere: Diacetsäure		4,2 „	
		15% =	45 „		β-Oxybuttersäure	11,4 mg =	6,3 „	
			252 mg				67 mg	
IV.	Blut: Diacetsäure		382 mg	Als mg Aceton angegeben	Blut: Diacetsäure		79 mg	Als mg Aceton angegeben
	β-Oxybuttersäure	55 mg =	29 „		β-Oxybuttersäure	90 mg =	49 „	
			411 mg		Niere: Diacetsäure		8,6 „	
		15% =	62 „		β-Oxybuttersäure	35 mg =	19 „	
			349 mg				155,6 mg	
V.	Blut: Diacetsäure		287 mg	Als mg Aceton angegeben	Blut: Diacetsäure		103 mg	Als mg Aceton angegeben
	β-Oxybuttersäure	31 mg =	17 „		β-Oxybuttersäure	28 mg =	15,5 „	
			304 mg		Niere: Diacetsäure		6,8 „	
		15% =	46 „		β-Oxybuttersäure	31,5 mg	17 „	
			258 mg				142,3 mg	
VI.	Blut: Diacetsäure		300 mg	Als mg Aceton angegeben	Blut: Diacetsäure		53 mg	Als mg Aceton angegeben
	β-Oxybuttersäure	57 mg =	31 „		β-Oxybuttersäure	78 mg	43 „	
			331 mg		Niere: Diacetsäure		10 „	
		15%	50 „		β-Oxybuttersäure	22,8 mg	12 „	
			281 mg				118 mg	

Zu den nichtexkretorischen Funktionen der Niere gehört also neben der Synthese der Hippursäure und der Phenacetursäure, neben der β-Oxydation der aromatischen Fettsäuren (7) *auch ein kräftiger Abbau der β-Oxybuttersäure und der Diacetsäure.*

In dieser Hinsicht müssen wir mit Nachdruck betonen, daß diese Resultate nur zu erhalten sind, wenn die überlebende intakte Niere mit Blut schnell durchströmt wird. Wiederholt man dieselben Versuche mit Nierenbrei, dann bekommt man ganz andere Resultate. Wir konnten nachweisen, daß der Nierenbrei, vermischt mit Diacetsäure, einen großen Teil (± 50%) der Diacetsäure in kurzer Zeit zu β-Oxybuttersäure reduziert, ohne daß dabei erhebliche Mengen der Diacetsäure verschwinden. Die sogenannte Ketoreduktase von *von Lagermark* besteht also tatsächlich: sie kommt aber nur zur Wirkung im Nierenbrei; bei der Funktion der überlebenden Niere ist von einer Reduktion der Diacetsäure zu β-Oxybuttersäure kaum etwas zu spüren.

Nierenbrei hat auf zugesetzte β-Oxybuttersäure gar keine Einwirkung.

Das Resultat dieser Versuche darf als Warnung gelten, die Resultate, welche man mit einem Organbrei erhält, nicht auf die normale Organfunktion zu beziehen.

Zusammenfassung.

Nach Durchströmung der normalen überlebenden Niere (Hund und Schaf) mit Blut, dem Diacetsäure zugesetzt ist, waren in Blut und Niere nach der Durchströmung nur 27 bis 55% der zugesetzten Menge Diacetsäure wiederzufinden. Die überlebende Hunde- und Schafsniere konnte von der mit Blut zugeführten Diacetsäure (variierend von 177 bis 349 mg, als Aceton berechnet) in den sechs angeführten Versuchen 68, 67, 73, 52, 45 und 58% zum Verschwinden bringen. Von der übergebliebenen Diacetsäure war ein kleiner Teil in Form von β-Oxybuttersäure anwesend. Die Niere reduzierte in den verschiedenen Versuchen bzw. 5, 6, 1, 11, 6 und 8% der zugesetzten Diacetsäure zu β-Oxybuttersäure.

Es besteht also mit Bezug auf den Ketokörperstoffwechsel ein prinzipieller Unterschied zwischen Leber und Niere.

Die Leber oxydiert von der zugesetzten β-Oxybuttersäure 16 bis 33% zu Diacetsäure, bringt aber nur wenig β-Oxybuttersäure zum Verschwinden. Die Leber reduziert von der zugesetzten Diacetsäure 50 bis 60% zu β-Oxybuttersäure, bringt aber nur wenig Diacetsäure zum Verschwinden.

Die Niere läßt einen großen Teil (29 bis 70%) der zugesetzten β-Oxybuttersäure verschwinden, ohne daß zu gleicher Zeit eine Oxy-

dation zu Diacetsäure entsteht. Die Niere läßt einen großen Teil (50 bis 70%) der zugesetzten Diacetsäure verschwinden, während zu gleicher Zeit ein kleiner Teil (1 bis 11%) zu β-Oxybuttersäure wird.

Diese Resultate sind nur zu erhalten, wenn man die überlebende Niere mit Blut durchströmt. Im Nierenbrei spielen sich ganz andere Prozesse ab als in der überlebenden Niere, und die Resultate der Breiversuche dürfen also nicht auf die normale Organfunktion bezogen werden.

Literatur.

1) *Snapper* und *Grünbaum*, diese Zeitschr. **181**, 410, 418, 1927. — 2) *Dieselben*, ebendaselbst **167**, 100, 1926. — 3) *Dieselben*, ebendaselbst **175**, 357, 1926. — 4) *Embden* und *Michaud*, Hofm. Beitr. **XI**, 332, 1908. — 5) *Von Lagermark*, diese Zeitschr. **55**, 458, **1913**. — 6) *Snapper* und *Grünbaum*, ebendaselbst **181**, 421, 1927. — 7) *Dieselben*, ebendaselbst **150**, 12, 1924.

Enthält das diabetische Serum Stoffe, welche die Permeabilität der Zelle für Traubenzucker beeinflussen?

Von

E. Bissinger.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 2. April 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Geiger und *Loewi*[1]) haben angegeben, eine mit glykosehaltiger Ringerlösung durchströmte Froschleber entnehme der Durchströmungsflüssigkeit keinen Zucker mehr, wenn der Durchströmungsflüssigkeit diabetisches Menschenserum zugesetzt werde. (Bestimmt durch Analyse der Durchströmungsflüssigkeit vor und nach Durchtritt durch die Leber.) Zur Erklärung wurden in den diabetischen Seren Stoffe angenommen, welche die Permeabilität der Zellwand für Glykose ändern sollten.

Bernhard[2]) fand, daß die Zuckeraufnahme der unbeeinflußten Froschleber von dem Unterschied in der Zuckerkonzentration zwischen Zellinnerem und Durchströmungsflüssigkeit abhängig ist. Diffusionsgleichgewicht bestand bei etwa 0,13 % Glykose in der Außenflüssigkeit; bei geringerer Zuckerkonzentration außen tritt Zucker aus der Leberzelle aus, bei höherer in sie ein.

Durchströmt man die Froschleber mit einer Zuckerlösung, deren Konzentration über 0,13 % Glykose liegt, setzt aber gleichzeitig Einflüsse auf die Zelle, welche die Konzentration des freien Zellzuckers erhöhen, so ist zu erwarten, daß nunmehr bei einer *höheren* Zuckerkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit als 0,13 % Glykose Diffusionsgleichgewicht eintritt, wenn eben die Zuckerkonzentration intra- und extracellulär ein ähnliches Verhältnis aufweist wie bei der unbeeinflußten Froschleberzelle, die mit einer 0,13 % Zuckerlösung in Berührung steht[3]).

Dann ist die Leberzelle *scheinbar* für Zucker von außen nach innen impermeabel.

---

[1]) *Geiger* und *Loewi*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **198**, 633, 1923.
[2]) *Bernhard*, diese Zeitschr. **153**, 61, 1924.
[3]) Vgl. hierzu *Lesser*, Innere Sekretion des Pankreas, Handb. d. Biochem. **9**, 185 u. 186, 1925.

Wenn man die aus der Durchströmungsflüssigkeit verschwundene Zuckermenge zu der während des Versuchs eingetretenen Erhöhung des freien Leberzuckers in Beziehung setzt, kann man entscheiden, wieweit diese Vorstellung zutrifft. Liegen den von *Geiger* und *Loewi* gefundenen Änderungen in der Zuckeraufnahme Permeabilitätsänderungen der Grenzschicht der Zelle zugrunde, so muß die aus der Durchströmungsflüssigkeit verschwundene Zuckermenge und die Zunahme des freien Leberzuckers von etwa gleicher Größenordnung sein. Voraussetzung ist dabei, daß Polymerisation des aufgenommenen Zuckers und Hydrolyse des Leberglykogens möglichst gering sind. Erstere spielt beim Frosch wohl kaum eine große Rolle; letztere muß durch Einhalten physiologischer Bedingungen möglichst gehemmt werden.

Methodik.

Die benutzten Frösche waren, wie der hohe Glykogengehalt aller Lebern zeigt, Winterfrösche (fast ausschließlich weibliche Eskulenten), die den ganzen Winter in einer mit Moos gefüllten Grube im Freien gehalten worden waren. Vor dem Versuch wurden sie über Nacht im Experimentierraum in Wasser von Zimmertemperatur gehalten.

Sämtliche Versuche konnten bei gleicher Temperatur durchgeführt werden, da die Temperatur des Experimentierraums sich dauernd praktisch konstant auf 21° hielt.

Die Durchströmung erfolgte nach der von *Fröhlich* und *Pollak*[1]) angegebenen Methode (Einstrom durch die Vena abdominalis leberwärts, Ausfluß durch eine in den Venensinus eingebundene Kanüle).

Das pankreasdiabetische Froschserum wurde von Fröschen gewonnen, die 3 Tage vor dem Versuch pankreatektomiert waren und zunächst in Moos im Freien gehalten wurden. Etwa 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurden sie in Wasser von Zimmertemperatur gebracht. Zur Serumgewinnung wurde das Herz des lebenden Tieres freigelegt, dann angeschnitten, das abtropfende Blut, möglichst ohne daß es mit der Wunde in Berührung kam, ohne Zusätze im Zentrifugenglas gesammelt und nach eingetretener Gerinnung scharf zentrifugiert. Um genügend Serum zu erhalten, mußten jedesmal sieben bis zehn Tiere verwendet werden. In allen Fällen wurde so klares, hämoglobinfreies Serum erhalten, dessen Zuckergehalt, nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt, 0,250 % betrug. Es bestand bei allen Tieren starke Glykosurie.

Als Durchströmungsflüssigkeit diente die von *Barkan*, *Broemser* und *Hahn*[2]) angegebene Lösung, der nach Bedarf Glykose, Serum oder beides zugesetzt wurde. Der Zuckergehalt wurde zu etwa 0,350% gewählt, um stets in der Durchströmungsflüssigkeit eine Zuckerkonzentration zu haben, bei der nach den Versuchen von *Bernhard* eine Zuckeraufnahme durch die Leberzelle gewährleistet war. Die zunächst genau nach Vorschrift hergestellte Lösung, gesättigt mit dem von den Autoren angegebenen Gasgemisch (dessen CO_2-Gehalt im Haldane-

---

[1]) *Fröhlich* und *Pollak*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Pharm. **77**, 265, 1914.
[2]) *Barkan*, *Broemser* und *Hahn*, Zeitschr. f. Biol. **74**, 1, 1922.

apparat kontrolliert wurde) ergab aus bisher nicht ermitteltem Grunde regelmäßig ein p_H von 7,2 anstatt 7,6. Aus diesem Grunde wurde für alle Versuche eine Lösung benutzt, die 0,15% Bicarbonat enthielt und die mit einem Gasgemisch gesättigt wurde, das konstant 2% CO_2 enthielt. Das p_H dieser Lösung betrug im Mittel 7,6 (Wasserstoffkette).

Da sich weiterhin zeigte, daß die Lösung auf den PO_4-Gehalt des Froschserums (21 mg PO_4 pro 100 ccm Serum) gebracht werden konnte, ohne daß Trübungen auftraten, wurde dieser PO_4-Gehalt gewählt.

Da die Abmessung der CO_2 mit der von den Autoren angegebenen Apparatur nicht besonders genau erfolgen konnte und bis zur Erreichung des richtigen CO_2-Gehalts (Kontrolle im Haldaneapparat) immer mehrfaches Probieren nötig war, wurde folgende Anordnung benutzt (Abb. 1). Die 10 Liter fassende, am Boden tubulierte Flasche *A* wurde völlig luftblasenfrei mit angesäuertem Wasser gefüllt und dann

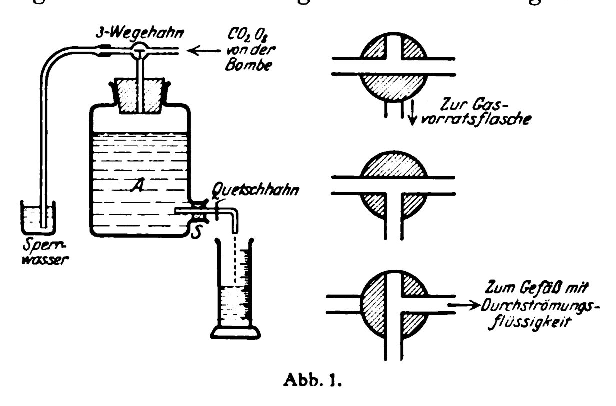


Abb. 1.

oben durch einen Gummistopfen, der einen Dreiwegehahn trug, verschlossen. Nun wurde der Dreiwegehahn in die Stellung *a* gebracht (Abb. 1) und CO_2 durchgeleitet, bis das ganze Röhrensystem mit CO_2 gefüllt war. Dann wurde, während das Gas weiterströmte, der Hahn in Stellung *b* gebracht und nun durch den unteren Tubus so viel Wasser abgelassen (Meßzylinder), als CO_2 in die Flasche eingeführt werden mußte. Dann wieder Hahnstellung 1 und in gleicher Weise Einführung der erforderlichen Menge O_2. Es wurden immer 10 Liter Gasgemisch hergestellt. Der Gehalt des Gases an CO_2 wurde stets im Haldaneapparat kontrolliert. Das Gasgemisch wurde dann dadurch durch die Durchströmungsflüssigkeit gepreßt, daß aus einer hochgestellten *Mariotte*schen Flasche angesäuertes Wasser durch den Tubus *S* in die Flasche mit dem Gasgemisch trat. Dabei Hahnstellung *c*.

Die Durchströmungsflüssigkeit befand sich in einer oben doppelt, unten einfach tubulierten *Wulff*schen Flasche, die etwa 250 ccm faßte. In den einen oberen Tubus war mit einem durchbohrten Gummistopfen

das bis zum Boden reichende Gaszuführungsrohr eingesetzt; in den anderen oberen Tubus ebenso ein Rohr mit Glashahn, das direkt unter dem Gummistopfen endigte. Bei zunächst offenem Glashahn wurde die Durchströmungsflüssigkeit mit dem Gasgemisch gesättigt; darauf wurde der Hahn geschlossen, das Präparat an den unteren Tubus angeschlossen und die Durchströmungsgeschwindigkeit dadurch reguliert, daß die *Mariotte*sche Flasche und ihr Tauchrohr in passende Höhe eingestellt wurden.

Da das p_H immer mit der Wasserstoffkette nach *Michaelis* kontrolliert wurde, wurde die von *Barkan*, *Broemser* und *Hahn* angegebene Vorrichtung zur kolorimetrischen Kontrolle des p_H weggelassen.

In den Versuchen mit diabetischem Froschserum wurden 5 ccm desselben mit zuckerhaltiger Barkanlösung auf 45 ccm gebracht. Die von *Geiger* und *Loewi* angegebenen Mengenverhältnisse konnten dabei nicht genau eingehalten werden, da nicht genügend Serum zur Verfügung stand.

In den Versuchen mit Menschenseren wurden die Verdünnungen mit zuckerfreier oder zuckerhaltiger Barkanlösung genau nach den Angaben von *Geiger* und *Loewi* hergestellt. (12,5 ccm Serum + 6 ccm destilliertes Wasser mit Barkanlösung auf 60 ccm aufgefüllt.)

Das p_H der Durchströmungsflüssigkeit wurde stets mit der Wasserstoffkette nach *Michaelis* bestimmt. Es lag stets zwischen 7,5 und 7,6.

Versuche der Tabelle I.

Jedes Präparat wurde, auf eine Petrischale gelagert, zunächst 30 Minuten lang mit 50 ccm Barkanlösung ohne Zucker- oder Serumzusatz unter leichtem Massieren blutfrei gespült, dann, auf eine frische Petrischale gelagert, an das Gefäß mit Barkanzucker- oder Barkanzuckerserumlösung angeschlossen, die in den Lebergefäßen enthaltene zuckerfreie Barkanlösung mit 5 ccm Barkanzucker- oder Barkanzuckerserumlösung verdrängt und dann in einer Stunde 30 ccm dieser Lösung durchgeschickt. Dann wurde die in den Lebergefäßen befindliche Barkanzucker- bzw. Barkanzuckerserumlösung durch 2 ccm zucker- und serumfreie Barkanlösung verdrängt, die Leber zwischen Filtrierpapier getrocknet, gewogen, unter 96% Alkohol zerrieben und der dünne Brei in ein Zentrifugenglas gebracht. Nach 12stündigem Stehen wurde der zuckerhaltige Alkohol abzentrifugiert, das Sediment mit 96% Alkohol auf der Zentrifuge zuckerfrei gewaschen, der Rückstand nach *Pflüger* auf Glykogen verarbeitet. Der zuckerhaltige Alkoholextrakt wurde auf dem Wasserbad unter Wasserzusatz vom Alkohol befreit, mit kolloidalem Eisen enteiweißt, auf bekanntes Volumen gebracht und eine möglichst große Menge nach *Bertrand* verarbeitet.

Der Zuckergehalt der Durchströmungsflüssigkeit vor dem Eintritt in die Leber wurde in fast allen Versuchen dadurch bestimmt, daß unmittelbar vor Durchströmung eines jeden Präparats eine Probe der Durchströmungsflüssigkeit der Vorratsflasche entnommen und nach Enteiweißung mit kolloidalem Eisen nach *Bertrand* analysiert wurde. Der erhaltene Wert wurde bei dem betreffenden Präparat zugrunde gelegt. Dabei wurden von der Durchströmungsflüssigkeit sowohl vor wie nach dem Durchtritt durch die Leber bei jedem Präparat gleiche Mengen mit gleichen Meßgeräten abgemessen und in möglichst gleicher Weise verarbeitet.

Versuche der Tabelle II.

Die Leber wurde mit 50 ccm reiner Barkanlösung in 30 Minuten blutfrei gewaschen, dann wie bei den Versuchen der Tabelle I das Präparat an das Gefäß mit der Barkanserumlösung angeschlossen, die Reste Waschflüssigkeit durch 5 ccm Barkanserumlösung verdrängt und nun in zwei Perioden von je 30 Minuten je 30 ccm Barkanserumlösung durchgeschickt. Die in jeder Periode durchgetretene Flüssigkeit wurde getrennt aufgefangen, der Zuckergehalt darin nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt. Zur Bestimmung des Glykoseeigenwertes der Durchströmungsflüssigkeit wurde vor und nach der Durchströmung eine Probe aus der Vorratsflasche in gleicher Weise verarbeitet. Dieser in der Durchströmungsflüssigkeit enthaltene Zucker wurde von dem Zuckerwert, der nach Austritt aus der Leber gefunden wurde, abgezogen.

Um den Gehalt der Leber an Zucker zu Beginn der Durchströmung mit Barkanzucker- oder Barkanzuckerserumlösung zu bestimmen, wurden fünf Lebern genau wie in den anderen Versuchen 30 Minuten mit 50 ccm zuckerserumfreier Barkanlösung durchspült, dann wie oben auf Zucker und Glykogen verarbeitet.

Die normalen Menschenseren rührten von Patienten der chirurgischen Abteilung her (Frakturen), die geheilt vor der Entlassung standen und klinisch gesund waren.

Die diabetischen Menschenseren stammten von klinisch sicheren Fällen von Diabetes melitus, die nur diätetisch behandelt worden waren und noch kein Insulin erhalten hatten. (Weibliche Patienten zwischen 40 und 60 Jahren; Blutzucker im Mittel 0,250 %; Glykosurie zwischen 3 und 5 %; geringe Ketonurie. In einem Falle Atherosclerose mit Hypertonie von 150 mm Hg; in den übrigen Fällen neben dem Diabetes keine klinischen Erscheinungen.)

Für jede Versuchsreihe wurde ein anderer Blutspender benutzt.

Es wurden durchgeführt: eine Versuchsreihe mit Barkanzuckerlösung (sechs Lebern).

Zwei Versuchsreihen mit Barkanzuckerlösung, die pankreasdiabetisches Froschserum enthielt (je eine Leber).

Drei Versuchsreihen mit Barkanzuckernormalserumlösung (Mensch) (je zwei, zwei, eine Leber).

Drei Versuchsreihen mit Barkanzuckerdiabetesserumlösung (Mensch) (je zwei, zwei, drei Lebern).

Die Einzelwerte in den verschiedenen Versuchsreihen (Versuchszeit Februar/März 1927) schwankten stark, besonders die Werte für die Zuckeraufnahme durch die Leber, berechnet auf Grund der Analyse der Durchströmungsflüssigkeit vor und nach Durchtritt durch das Organ. Das hat verschiedene Gründe. Einmal war ein Teil der Lebern ziemlich klein (etwa 1 g), so daß nur sehr kleine Zuckermengen aufgenommen wurden, wodurch die unvermeidlichen Analysenfehler stark ins Gewicht fielen. Weiter floß in fast allen Versuchen ein Teil der Durchströmungsflüssigkeit neben der Ausflußkanüle ab, wobei Konzentration durch Verdunstung des Lösungsmittels eintrat, und zwar von Fall zu Fall verschieden stark. Als weitere Fehlerquellen seien angeführt



das nicht ganz genaue Aufsammeln der durchgetretenen Flüssigkeit, der Umstand, daß ein Teil der Werte mit Differenzmethoden bestimmt wird. Da im Einzelfall diese verschiedenen Umstände oft unübersehbar interferierten, werden die Schwankungen der Einzelwerte verständlich. In den tabellarischen Zusammenstellungen werden deshalb nur die Mittelwerte aus allen Versuchen einer Versuchsreihe gebracht; die Maximal- und Minimalwerte, die dabei aufgetreten waren, finden sich in den Spalten, die die experimentell bestimmten Zahlen enthalten, unter den Mittelwerten in Klammern angegeben[1]).

In der Tabelle I sind die Versuche zusammengestellt, in denen die bei der Durchströmung mit Zucker- bzw. Zuckerserumlösungen aus der Durchströmungsflüssigkeit verschwundene Zuckermenge verglichen wird mit der gleichzeitig in der Zelle aufgetretenen Zuckermenge.

Die Tabelle II bringt Versuche, die entscheiden sollten, ob von den Seren hyperglykämisierende Einflüsse auf die Leberzelle ausgeübt werden.

Diskussion der Tabelle I.

Spalte 1. Der Befund von *Geiger* und *Loewi* wird insofern bestätigt, als die Froschleber aus einer mit diabetischen Seren versetzten Barkanzuckerlösung weniger Zucker aufnimmt als aus einer etwa gleich viel Zucker enthaltenden serumfreien Salzlösung.

Spalte 2. Wert für den freien Leberzucker der mit zucker- und serumfreier Barkanlösung blutfrei gewaschenen Froschleber. Mittel aus fünf Lebern.

Spalte 3. Legt man den freien Gewebszucker der blutfrei gespülten Leber aus Spalte 2 zugrunde, so ergeben sich in Verbindung mit den Werten der Spalte 1 für den freien Leberzucker nach der Durchströmung mit den verschiedenen Lösungen die hier berechneten Werte.

Spalte 4 gibt die experimentell gefundenen Werte für den freien Leberzucker. Der Vergleich mit Spalte 3 zeigt, daß in den Versuchen mit reiner Barkanzuckerlösung und Barkanzuckerlösung mit Zusatz von normalem Menschenserum die berechneten und gefundenen Werte für den freien Leberzucker innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmen. Bei den Versuchen mit diabetischen Seren (Frosch, Mensch) liegen die gefundenen Werte dagegen erheblich über den in Spalte 3 berechneten.

Spalte 5. Die Menge dieses „hepatogenen“ Zuckers ist hier aus der Differenz Spalte 4 — Spalte 3 berechnet. Der „hepatogene“ Zucker entsteht durch Hydrolyse aus dem Leberglykogen. Der Beweis hierfür kann mit den Werten der Glykogenanalysen in Spalte 6 nicht geführt werden, und zwar aus folgendem Grunde. Benutzt wurde die von *Geiger* und *Loewi* angewendete Methode. Um nun vergleichbare Werte

[1]) Vgl. hierzu *Bernhard*, diese Zeitschr. **153**, 61, 1924.



Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aufgenommen aus der Durchströmungsflüssigkeit	Freier Leberzucker vor Durchströmung mit der zuckerhaltigen Lösung	Freier Leberzucker berechnet (nach Durchströmung mit der zuckerhaltigen Lösung)	Freier Leberzucker gefunden (nach Durchströmung mit der zuckerhaltigen Lösung)	Hepatogener Zucker berechnet	Leberglykogen nach Durchströmung mit der zuckerhaltigen Lösung g Glykogen pro 100 g Leber	Zuckergehalt der Durchströmungsflüssigkeit $\frac{\text{g Glykose}}{\text{100 ccm}}$	Werte der Spalte 4 dividiert durch Werte der Spalte 7 $\frac{C_1}{C_2}$	Mittelwert aus wieviel Lebern	Art des Versuchs
mg Glucose pro 100 g Leber									
229 (112–298)	59 (31—104)	288	263 (201–335)	— 25	12	0,360	0,702	6	A. Barkanlösung mit 0,350 % Glykose.
8 (– 40 – + 56)	(Mittelwert aus 5 Lebern)	67	230 (180–281)	163	8	0,355	0,647	2	B. 5 ccm diabetisches Froschserum mit Barkanlösung mit 0,350 % Glykose auf 45 ccm aufgefüllt.
139 (97–193)		198	191 (187–196)	— 7	12	0,323	0,589	5	C. 12,5 ccm normales Menschenserum mit 6 ccm destillierten Wassers versetzt und mit Barkanlösung mit 0,350 % Glykose auf 60 ccm gebracht.
65 (– 30 – +118)		124	226 (180—275)	101	14	0,316	0,715	7	D. Wie C., nur diabetisches Menschenserum.

für den Glykogengehalt der Leber vor und nach der Durchströmung zu bekommen, hätte vor Beginn der Durchströmung mit den Zuckerserumlösungen ein Leberlappen abgebunden und auf Glykogen verarbeitet werden müssen. Da nun die Lebern teilweise klein waren (1 g), wäre der Leberrest und damit die Zuckeraufnahme zu klein ausgefallen. Außerdem beträgt die gebildete Zuckermenge höchstens 2% des Glykogengehalts der Leber; sie würde also in die Fehlergrenze der Glykogenbestimmung fallen. Die Glykogenanalysen wurden nur ausgeführt, um nachzuweisen, daß es sich in allen Fällen um Winterfrösche mit glykogenreicher Leber, also um Tiere mit gleicher Stoffwechsellage handelte.

Tabelle II.

Periode 1 30′	Periode 2 30′	Leberglykogen	Mittelwert aus wieviel Lebern	Art des Versuchs
abgegeben	mg Glykose / 100 g Leber	g / 100 g Leber		
125	125	8	1	A. Barkanlösung, zucker- und serumfrei
112	133	9	2	B. 12,5 ccm normales Menschenserum mit 6 ccm destillierten Wassers versetzt und mit zuckerfreier Barkanlösung auf 60 ccm gebracht
120	204	8	2	C. Wie B., nur diabetisches Menschenserum

Diskussion der Tabelle II.

Bei der Durchströmung der Leber mit zucker- und serumfreier Barkanlösung ist die Zuckerabgabe in Periode 1 und 2 gleich. Bei der Durchströmung mit Barkanlösung, der normales Menschenserum in den angegebenen Mengenverhältnissen zugesetzt ist, findet in der zweiten Periode ein leichtes Ansteigen der Zuckerabgabe statt.

Der Zusatz von diabetischem Serum (Mensch, Versuche mit diabetischem Froschserum waren nicht möglich, da nicht mehr genügend Tiere zur Verfügung standen) bewirkt starke Vermehrung der Zuckerabgabe in der zweiten Periode im Vergleich zur ersten.

Es enthält also das normale Serum in geringer, das diabetische in größerer Menge etwas, das nach Art des Adrenalins oder oberflächenaktiver Alkohole zuckertreibend auf die Leber wirkt.

Die Versuche zeigen, daß, entsprechend den einleitend angegebenen Überlegungen, die von *Geiger* und *Loewi* nachgewiesene Verringerung der Zuckeraufnahme der Leber bei Durchströmung mit Zuckerlösungen, denen diabetische Seren zugesetzt sind, darauf zurückzuführen ist, daß durch in den diabetischen Seren enthaltene Stoffe die Konzentration des freien Leberzuckers erhöht wird. Dadurch wird das Diffusionsgefälle für Traubenzucker von außen und innen verkleinert. Um eine Änderung der Permeabilität der Grenzschicht der Zelle für Glykose handelt es sich bei diesem Vorgang nicht.

Bildet man aus den Werten der Spalten 4 und 7 den Quotienten

$$\frac{\text{Zuckerkonzentration in der Leber}}{\text{Zuckerkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit}} \quad \frac{C_1}{C_2}\text{[1]},$$

so ergeben sich die Werte, die in Spalte 8 der Tabelle I angeführt sind. Diese Werte (0,59 bis 0,72) liegen den von *Bernhard* bei der Rattenleber gefundenen Werten (0,68 bis 0,77) recht nahe, obwohl nur 1 Stunde durchströmt worden ist, also vielleicht noch kein völliges Gleichgewicht zwischen Zellinnerem und Durchströmungsflüssigkeit eingetreten war. Sie zeigen aufs deutlichste, daß keine Permeabilitätsänderung erfolgt ist, sondern daß sich der Zucker in allen Versuchen in konstantem Verhältnis zwischen Durchströmungsflüssigkeit und Leberzelle verteilt hat, gleichgültig, ob Serumzusätze zur Durchströmungsflüssigkeit gemacht worden sind oder nicht. Es ist also nebensächlich, ob sich der Leberzucker durch Hydrolyse des Glykogens oder durch Einstrom aus der Durchströmungsflüssigkeit erhöht.

Zusammenfassung.

1. Die experimentellen Befunde von *Geiger* und *Loewi*, daß die überlebende Froschleber aus einer Zuckerlösung, der diabetische Seren zugesetzt sind, keinen Zucker aufnimmt, werden insofern bestätigt, als die Zuckeraufnahme in diesen Fällen stark herabgesetzt ist.

2. Es wird nachgewiesen, daß diese diabetesserumhaltigen Durchströmungsflüssigkeiten den Gehalt der Leber an freiem Gewebszucker stärker erhöhen, als dies der Fall sein dürfte, wenn nur der aus der Durchströmungsflüssigkeit verschwundene Zucker in die Leberzellen aufgenommen worden wäre.

3. Die von *Geiger* und *Loewi* erhobenen Befunde werden dadurch erklärt, daß die diabetischen Seren Stoffe enthalten, die den Gehalt der Leber an freiem Gewebszucker erhöhen. Es kommt dadurch zu einer Verkleinerung des Diffusionsgefälles von außen nach innen und damit zu einer Verringerung der Zuckerabwanderung aus der Durchströmungsflüssigkeit in die Zellen. Um eine Änderung der Permeabilität der Grenzschicht der Zelle für Glykose handelt es sich dabei nicht.

Den Herren Dr. *Kissling*, Direktor der städtischen Krankenanstalten, und Professor Dr. *Rost*, Abteilungsarzt der chirurgischen Abteilung daselbst, dankt Verfasser verbindlichst für die mehrfache bereitwillige Überlassung der Menschenseren.

[1] Vgl. hierzu *Bernhard*, diese Zeitschr. **157**, 396. 1925.

Der A-Vitamingehalt der Magermilch.

Von

J. Birger Platon.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 31. März 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Einleitung.

In einem früheren Aufsatz in dieser Zeitschrift (1) führte ich als Resultat vergleichender Fütterungsversuche mit Ratten an, daß die A-Vitamine beim Buttern von ungesäuerter Sahne durch den Luftsauerstoff nicht oxydativ beeinflußt werden. Auf gewöhnliche Weise in Luft gewonnene Butter zeigte sich demnach nicht weniger aktiv als Butter von der gleichen Sahne, die in einer Kohlensäureatmosphäre unter sonst gleichen Verhältnissen erhalten wurde. Der von *v. Wendt* (2) angeführte Umstand, daß Butter nur einen Teil der im Milchfett ursprünglich vorhandenen A-Vitamine enthält, kann also nicht auf einen Verlust beim eigentlichen Buttern zurückgeführt werden, sondern muß andere Ursachen haben.

In der Absicht, den Einfluß der verschiedenen in einer Molkerei vorkommenden Operationen auf die A-Vitamine der Milch zu ermitteln, habe ich als Beginn festzustellen versucht, ein wie großer Teil von diesen wirklich an das Fett gebunden ist, d. h. mit anderen Worten, wie sich die Verteilung bei der Entrahmung der Vollmilch gestaltet. Die Untersuchungen mußten hierauf abgebrochen werden, weshalb ich es als zweckmäßig erachte, die bisherigen Ergebnisse zu veröffentlichen, wenn auch nur ein Teil des Programms zur Ausführung gelangt ist.

Über diese Frage liegen schon mehrere Untersuchungen vor, aber die Resultate, zu denen die verschiedenen Forscher gekommen sind, widersprechen sich mitunter in hohem Grade. Nach *McCollum* (3) wird ungefähr die Hälfte der A-Stoffe der Vollmilch in der Molke wiedergefunden. In Übereinstimmung hiermit stehen die Ergebnisse, zu denen *Sherman*, *MacLeod* und *Kramer* (4) gekommen sind, daß die Magermilch einen höheren Gehalt an A-Vitaminen aufweist als ihrem Fettgehalt

entspricht, und diese Auffassung findet man oft, besonders in der populären Literatur vertreten.

Morgan (5) hat dagegen gefunden, daß 5 g Magermilchpulver („spray process“ product) täglich als A-Vitaminquelle für junge, weiße Ratten weniger effektiv war als 0,25 g Butterfett, und berechnet hieraus, daß Vollmilch im allgemeinen achtmal reicher an A-Vitaminen ist als die aus derselben separierte Magermilch.

Methodik.

Die Methodik bei diesen Untersuchungen ist in den benutzbaren Teilen dieselbe gewesen, wie die in der früher erwähnten Arbeit (*Platon*, l. c.). Die Untersuchungen wurden während der Monate März/Mai 1925 ausgeführt. Die Milch wurde vom Molkereiinstitut in Alnarp erhalten, und jeden Morgen wurde neue Milch geholt. Hierbei wurde eine Durchschnittsprobe der Milch von drei Lieferanten mit zusammen etwa 75 Kühen genommen. Die Milch wurde mit einem Handseparator bei 18° C entrahmt.

Von den Versuchstieren erhielten vier außer der Grunddiät Vollmilch in verschiedenen Mengen, um hierdurch über das für das Wachstum erforderliche Vollmilchminimum Aufschluß zu erhalten. Jedes Tier erhielt während der ganzen Versuchsperiode die gleiche tägliche Portion Vollmilch, ein Tier bekam 2,8 g, eines 2,0 g und zwei 1,75 g Vollmilch pro Tag.

Die übrigen Versuchstiere, außer zwei, die als Kontrolltiere dienten und die Grunddiät mit Zusatz von Lebertran erhielten, wurden mit der Grunddiät und Magermilch ad libitum gefüttert. Während der ganzen Versuchsperiode stammte die benutzte Magermilch jeden Tag von der Vollmilch, die am gleichen Tage zur Fütterung der Vollmilchratten verwendet wurde. Die Magermilch wurde verabreicht, indem die Wasserkolbe der Tiere anstatt mit Wasser, mit Magermilch gefüllt wurde. Das Füllen erfolgte einmal täglich, bei welcher Gelegenheit die Kolben nach der Herausnahme gewogen und dann wiederum gefüllt wurden.

Johnson (6) fand, daß größere Mengen flüssiger Milch bei Ratten nach einiger Zeit subnormales Wachstum hervorriefen. Diese Wirkung zeigte sich jedoch erst nach einigen Monaten; in meinen Versuchen wurde, um jede Behandlung der Milch zu vermeiden, über deren Einfluß auf die Vitamine man nichts Sicheres weiß, die Milch unkonzentriert verabreicht.

Ergebnisse.

In Abb. 1 sind die Gewichtskurven für sämtliche Vollmilchtiere und die beiden Kontrolltiere wiedergegeben. Aus den ersteren ergibt



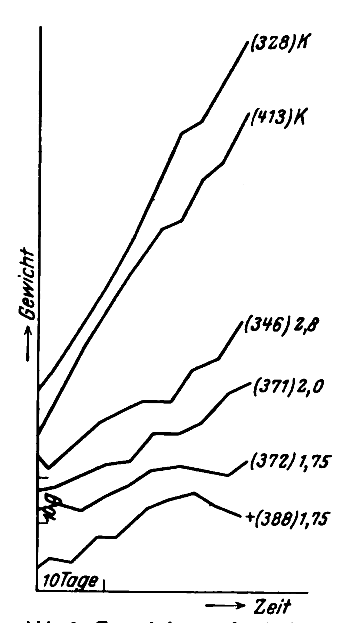
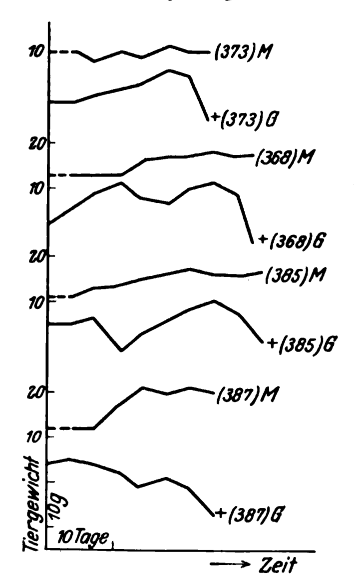


Abb. 1. Zuwachskurven für die Kontrolltiere (K) und für die mit Vollmilch gefütterten Versuchstiere. Die Zahlen nach den Nummern der Tiere geben die verabreichte Menge Vollmilch in Gramm pro Tag an.

sich, daß die für das Wachstum erforderliche Minimummenge Vollmilch zwischen 1,75 und 2,0 g pro Tier und Tag betrug.

In Abb. 2 sind die Gewichtskurven für die Magermilchratten zusammengestellt. Oberhalb jeder Gewichtskurve befindet sich eine Milchkurve, die die Menge der von der Ratte verzehrten Magermilch angibt. Hierbei wurde die Mittelmenge der verzehrten Milch in Gramm pro Tag während der 3 bzw. 4 Tage umfassenden Wägeperiode berechnet, welcher Wert gleichzeitig mit dem beim Wägen der Ratte erhaltenen Gewicht angegeben wurde.

Die Kurven zeigen, daß, obgleich die größte verzehrte Menge Magermilch pro Tag in einem Falle 20 g erreicht hat, trotzdem nicht die Menge erreicht worden ist, die ein zum Zuwachs genügendes Quantum A-Vitamin enthalten hätte.



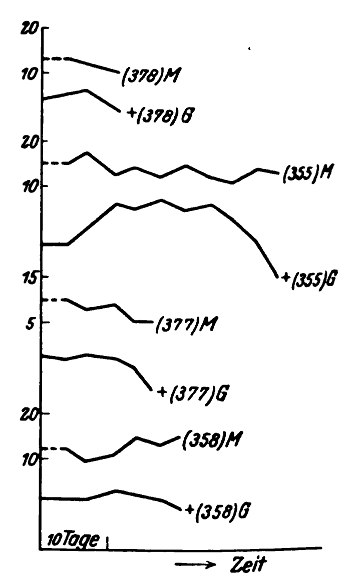


Abb. 2. Zuwachs- und Milchkurven für die mit Magermilch gefütterten Versuchstiere. Die Zahlen links der Kurven beziehen sich auf die Milchkurven und geben die verzehrte Menge Magermilch in Gramm pro Tag an. „M“ nach der Nummer der Ratte bedeutet Milchkurve und „G“ Zuwachskurve.

Der mittlere Fettgehalt der Vollmilch betrug 2,8 (± 0,1) % und der der Magermilch 0,18 (± 0,01) %. Die erstere enthielt demnach etwa 15mal soviel Fett als die letztere. Wären die A-Vitamine ausschließlich an das Fett gebunden, sollte eine gewisse Menge Vollmilch und eine 15mal größere Menge Magermilch in bezug auf die A-Vitaminwirkung adäquat sein. Wird die zum Hervorrufen von Zuwachs nötige Minimummenge Vollmilch bei diesen Versuchen auf zwischen 1,75 und 2,0 g pro Tag geschätzt, sollten unter oben angegebener Vorausssetzung etwa 28 g Magermilch erforderlich sein, um hinsichtlich des Vitamins den gleichen Effekt zu erzielen. Das größte täglich verzehrte Quantum Magermilch, das eines der Tiere während einer nennenswerten Zeitperiode verzehrt hat (20 g), war elfmal so groß wie die Zuwachs bewirkende Vollmilchmenge.

Obgleich also mit diesen Untersuchungen nicht vollkommen bewiesen ist, daß die A-Vitamine der Milch ausschließlich an das Fett gebunden sind, dürfte aus den hier mitgeteilten Resultaten doch hervorgehen, daß, wenn dies nicht der Fall ist, nur ein unbedeutender Teil dieser Vitamine an andere Milchbestandteile als das Fett gebunden sein kann.

Zusammenfassung.

Der A-Vitamingehalt von Vollmilch mit einem Mittelfettgehalt von 2,8 % und der von der gleichen Vollmilch herstammenden Magermilch mit einem Mittelfettgehalt von 0,18 % wurde nach der Methode von *Drummond* durch Fütterung junger Ratten bestimmt.

Die zum Hervorrufen von Zuwachs erforderliche Menge Vollmilch wurde zu 1,75 bis 2,0 g pro Tag bestimmt. Wären die A-Vitamine ausschließlich an das Fett gebunden, würde zur Erreichung des gleichen Effektes etwa 28mal soviel Magermilch notwendig sein. Die Magermilch wurde ad libitum verabreicht. Die größte Menge Magermilch, die ein Tier während nennenswerter Zeit verzehrte, betrug 20 g pro Tag, welche Quantität zur Hervorrufung des Zuwachses nicht hinlänglich war. Wenn ein Teil der A-Vitamine der Milch an andere Milchbestandteile als das Fett gebunden ist, dürfte dieser daher unbedeutend sein.

Literatur.

1) *J. Birger Platon*, diese Zeitschr. **154**, 228, 1925. — 2) *Georg v. Wendt*, Vitaminer, S. 44. Stockholm 1924. — 3) *E. V. McCollum*, Journ. of biol. Chem. **29**, 341, 521, 1917. — 4) *H. C. Cherman*, *E. L. Mac Leod* and *M. M. Kramer*, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. **17**, 41, 1920. — 5) *A. F. Morgan*, Amer. Journ. of Physiol. **64**, 538, 1923. — 6) *J. M. Johnson*, Public Health Service **36**, 2044, 1921.

Über die Regulation der Wasserstoffionenkonzentration im Blute.

I. Mitteilung:

Studien über die Natur der Potentialverläufe des Blutes bei Benutzung der Chinhydronelektrode, nebst theoretischer Erklärung.

Von

Schau-Kuang Liu (China).

(Aus der III. Medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 2. April 1927.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Die Berichte der verschiedensten Forscher (*Biilmann*, *Kolthoff*, *Mislowitzer*) ergeben, daß die Chinhydronelektrode für pufferreiche Lösungen, wie Blut, von p_H nicht über 8,0, oder eine Salzkonzentration von etwa m/5 schon übereinstimmende Resultate mit der Wasserstoffelektrode zeigt. Für Eiweiß, Serum oder Plasma und andere sauerstoffhaltige pufferarme Lösungen gibt es keine übereinstimmenden Resultate, vielmehr sind die Auffassungen und sogar die Erklärungen ganz verschieden. Die meisten Autoren sind der Meinung, daß bei diesen Lösungen Schwierigkeiten besonderer Art bestehen, die auf ihren Gehalt an Eiweiß, auf Oxydations-Reduktionssysteme und vor allem auf Hämoglobin zurückgeführt werden.

Unsere nachfolgenden Untersuchungen sollen versuchen, diesen komplizierten chemischen Vorgängen näherzukommen.

I. Messungen mit der Wasserstoff- und der Chinhydronelektrode.

Zur Methodik.

Zur Wasserstoffmessung wurden die U-Elektrode von *L. Michaelis* und die gesättigte Kalomelelektrode verwendet. Das nötige Wasserstoffgas wurde aus As-freiem Zink und verdünnter Schwefelsäure mit etwas $CuSO_4$ im *Kipp*schen Apparat entwickelt, mit 2% Lösung von K_2MnO_4 und dann mit konzentrierter Sublimatlösung gewaschen. Als Verbinder wurde der KCl-Agarheber gebraucht. Zur Chinhydronmessung benutzten wir die kleinste Form der Doppelchinhydronelektrode nach *E. Mislowitzer*. Die Elektroden wurden nach der Messung zuerst mit Leitungswasser gewaschen, geglüht und dann auf einige Minuten in Bichromat-Schwefelsäure getaucht, wieder in destilliertem Wasser gewaschen, geglüht und mit ausgekochtem,

destilliertem Wasser gut gespült. Wir benutzten die Standardelektrodenflüssigkeit. Da diese, wie *E. Mislowitzer* schon berichtet hat, jeden Tag um ein Millivolt unedler wird, kontrollierten wir die Kette mit Standardacetatlösung (nach *L. Michaelis*) und der *Veibel*-Elektrode. Das Potential wurde mit dem Potentiometer nach *E. Mislowitzer* gemessen, mit dem man die Werte bis 0,003 Volt genau ablesen kann. Bei der Ablesung sind die folgenden drei Punkte besonders zu beachten: 1. Der Zeiger des Potentiometers ist sehr fein. Man lese nur mit einem Auge ab, damit keine Fehler, wie Aberration oder Doppelbild, vorkommen, und der Zeiger und sein Spiegelbild mit der roten Nullinie vollständig in eins zusammenfallen. 2. Obwohl berichtet wird, daß die absoluten Mengen von Chinhydron nicht von Bedeutung sind, soll man doch stets eine passende Menge von Chinhydron zufügen. Zu viel Chinhydron verhindert richtiges Durchrühren und damit genaue Messung, während sich bei zu wenig Chinhydron die Lösung nicht hinreichend sättigen läßt, so daß ein falsches Potential entsteht. 3. Da es vorteilhafter ist, mit frischem arteriellen Blute zu arbeiten, bedienten wir uns zu unseren Messungen frischen arteriellen Blutes, direkt durch Punktion der linken Herzkammer von Kaninchen gewonnen.

Vor der Messung wurde die physiologische Kochsalzlösung mit passender Menge Chinhydronpulver durch Rühren mit der Platinelektrode vermischt und gleich mit Paraff. liquid. überschichtet. Die Elektrode stand vor der Messung 1 bis 2 Minuten in dieser Flüssigkeit. Das frische Blut wurde mit einer Spritze unterschichtet und mit der Elektrode 5 Sekunden lang durchgerührt.

Tabelle I.

Messung des arteriellen Blutes in einer 1 : 4-Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung.

Nr.	Wasserstoffelektrode			Chinhydronelektrode		
	Temperatur °C	Millivolt	p_H	Temperatur °C	Millivolt	p_H
1	22	665	7,17	22	167,0	7,18
2	22	679	7,41	22	161,5	7,43
3	20	677	7,40	22	168,0	7,43
4	20	679	7,44	22	161,0	7,45
5	23	668	7,31	21	150,0	7,34

Die p_H-Werte von beiden Elektroden kommen einander sehr nahe, doch sind sie bei der Chinhydronelektrode um ungefähr 0,01 bis 0,03 p_H größer als bei der Wasserstoffelektrode. Unsere Resultate stimmen mit denen von *Mislowitzer*, *Schäfer* und *Schmidt* überein. Da diese Autoren das p_H von Serum, Hämoglobinlösung, Harn, Magensaft usw. näher ausgeführt haben, haben wir die Untersuchungen in dieser Richtung nicht weiter fortgesetzt.

II. Über die Potentialverläufe des Blutes bei Benutzung der Chinhydronelektrode.

Es ist lange bekannt, daß die Chinhydronelektrode ein veränderliches Potential liefert. *Mislowitzer* gibt an, daß bei frischem Blut ein

Potentialanstieg in den ersten 75 Sekunden um etwa 4 Millivolt erfolgt. Seine Resultate zeigen, daß das Potential bei manchem Blute von der fünften, bisweilen bis zur achten Minute abzufallen beginnt. Der Verlauf ist danach schwankend und zeigt große Abweichungen in normalem Blute. Nach unserer Messung ist das Resultat nicht ganz so unbestimmt; es ergeben sich nur wenig Schwankungen.

A. Messung mit der Platinelektrode.

Das Resultat macht ersichtlich, daß das Potential von 15 Sekunden bis zum Ende der ersten Minute zum Maximumwert ansteigt. Es bleibt nun 1 bis 2 Minuten lang ganz konstant; dann beginnt es abzufallen. Der Potentialabfall verläuft zuerst schnell und dann immer langsamer, ohne aber zu vollständigem Stillstand zu gelangen. Der Verlauf des Potentials ist ziemlich stetig. Es zeigen sich wenig Schwankungen und Abweichungen, wenn das normale frische Blut richtig gemessen wird.

Tabelle IIa.

Potentialverlauf (Platinelektrode).
Messungen von 1 : 4 verdünntem arteriellen Vollblut.

Zeit	Nr. 1 Millivolt	Nr. 2 Millivolt	Nr. 3 Millivolt	Nr. 4 Millivolt
1/4′	163,8	165,8	159,0	162,0
1/2	164,5	167,0	160,0	163,0
3/4	166,0	168,0	161,0	164,5
1	167,0	168,0	161,5	165,0
2	167,0	168,0	161,5	165,0
3	167,0	167,0	161,0	164,0
4	166,0	166,0	160,0	163,0
5	165,0	165,0	159,0	162,0
6	164,0	164,0	158,0	161,5
7	163,0	163,5	157,5	161,0
8	162,5	163,0	157,0	160,5
9	162,0	162,5	156,5	160,0
10	161,5	162,0	156,0	159,5
11	161,0			159,3
12				159,0

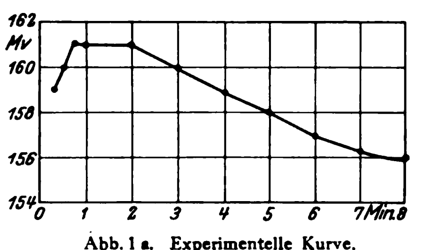


Abb. 1 a. Experimentelle Kurve. Potentialverlauf Blut Nr. 2.

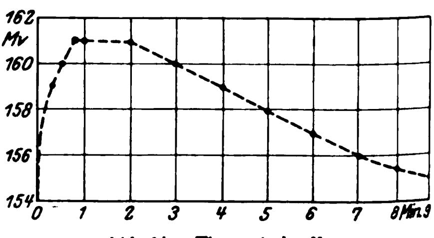


Abb. 1 b. Theoretische Kurve. Potentialverlauf Blut Nr. 2.

Tabelle IIb.

Zeit	Nr. 5 Millivolt	Nr. 6 Millivolt	Nr. 7 Millivolt	Nr. 8 Millivolt
1/4'	165,0	159,0	167,5	175,0
1/2	166,5	160,0	168,0	176,0
3/4	167,0	161,0	170,0	177,0
1	167,0	161,0	172,0	178,5
2	167,0	161,0	172,0	178,5
3	166,0	160,0	172,0	177,0
4	165,0	159,0	171,5	175,5
5	164,0	158,0	171,0	174,5
6	163,0	157,0	170,5	174,0
7	162,5	156,5	170,0	173,0
8	161,8	156,0	169,5	172,5
9	161,0	155,5	169,0	172,0
10	159,5	155,0	168,5	171,8
11	159,0	154,0	168,0	171,5
12	158,5	153,5	167,5	171,0
13	158,0	153,0	167,0	170,8
14	157,5	152,5	166,5	170,5
15	157,0	152,0	166,0	170,5
16	156,8	151,2	165,5	170,0
17	156,0	150,8	165,0	170,0
18	155,8	150,2	164,5	169,8
19	155,5	150,0	164,0	169,5
20	155,0	149,8	163,5	169,5
21	154,8	149,8	163,0	169,0
22	154,0	149,5	162,5	168,5
23		149,3	162,0	168,0
24		149,0	161,8	167,5
25		148,8	161,5	167,0
26		148,2	161,3	166,5
27		148,0	161,0	166,0
28		147,8	160,8	165,5
29		147,5	160,5	165,0
30		147,5	160,5	164,5
31			160,5	164,0
32			160,0	163,8
33			160,0	163,3
34			160,0	163,0
35			160,0	162,5
36			159,8	162,0
37			159,8	162,0
38				161,5
39				161,5
40				161,0
41				161,0
42				160,5
43				160,0
44				159,5
45				159,0
46				158,5
47				158,0
48				158,0
49				157,5
50				157,0

Wir haben den Verlauf der Potentiale in zwei Kurven dargestellt. Die Zeit (in Minuten) ist in Abszissen, und die Millivolt sind in Ordinaten dargestellt. Die Abb. 1a zeigt den Verlauf eines Chinhydronpotentials in den ersten 8 Minuten. Nach der Messung handelt es sich hier anscheinend um eine Kurve in drei deutlich erkennbaren Richtungen; in Wirklichkeit aber verläuft das Potential wie eine gewöhnliche chemische Reaktionskurve, vielleicht in der angegebenen Form (Abb. 1b).

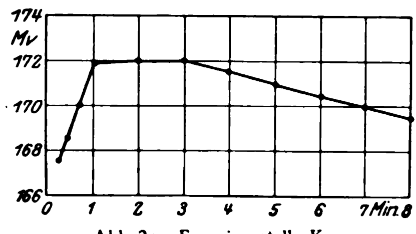



Abb. 2a. Experimentelle Kurve.
Potentialverlauf (Platinelektrode) Blut Nr. 7.

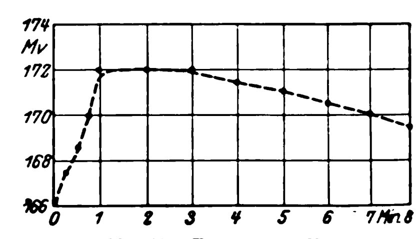


Abb. 2b. Theoretische Kurve.
Potentialverlauf (Platinelektrode) Blut Nr. 7.

Andererseits stellt die Potentialkurve auch die Gesamtreaktion nur in bezug auf die Wasserstoffionenkonzentration dar. *W. Ostwald* bezeichnet die Reaktionsgeschwindigkeit als proportional der wirksamen Menge der sich umwandelnden Stoffe. Drückt man die Reaktionsgeschwindigkeit dieser verwickelten Reaktion nur in bezug auf die Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration aus, so kann man schreiben:

$$\frac{dC}{dt} = K(C_1 - C_2), \tag{1}$$

wobei C_1 = Anfangskonzentration der Wasserstoffionen in der Lösung, C_2 = Konzentration der Wasserstoffionen in der betreffenden Zeit, K = Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion bedeutet. Gleichzeitig kann man natürlich aus den Potentialkurven die Geschwindigkeit der Potentialveränderung G erkennen.

$$\frac{\pi_1 - \pi_2}{t_1 - t_2} = G, \tag{2}$$

wobei π_1 und π_2 die Potentiale für die betreffenden Zeiten t_1 und t_2 sind. Anfangs ist die Reaktionsgeschwindigkeit während des Potentialanstiegs und auch -abfalls sehr groß, um sich dann immer mehr zu verlangsamen.

Die chemische Reaktion ist hier außerordentlich kompliziert und verwickelt. Es finden in ihr zweifellos Gegen- und Nebenreaktionen, vielleicht auch katalytische Reaktionen statt, auf die wir später noch eingehender zurückkommen werden.

Der Einfluß des Durchrührens auf die Potentialveränderungen.

Der Potentialanstieg verändert sich stark mit dem mechanischen Durchrühren.

Tabelle IIIa. Die Proben, die nur 1 bis 3 Sekunden lang durchgerührt wurden, zeigen erheblichen Abstieg, nämlich um ungefähr 7 bis 11 Millivolt. Diese starken Veränderungen sind wohl auf die ungleichartige, nicht genügende Durchmischung zurückzuführen. Die gar nicht durch Rühren gestörten Mischungen zeigen noch beträchtlichere, unbeständigere Schwankungen.

Tabelle IIIb. Aus dem Resultat ist ersichtlich, daß der Potentialanstieg nach 8 bis 10 Sekunden Durchrührens nur 0,8 bis 3 Millivolt beträgt. Die Zeit für die Durchmischung ist hier sicher zu lang, und das Blut ist schon stark verändert. Es gilt daher, eine passende Zeitdauer für das Durchrühren zu wählen, damit einerseits das Blut vollständig vermischt, andererseits aber nicht zu sehr verändert wird.

Tabelle IIIc. Nach einem Durchrühren von 4 bis 5 Sekunden ergibt das Resultat, daß der Potentialanstieg von Beginn (erste Ablesung) bis zum Maximum in den ersten 45 bis 60 Sekunden große Unregelmäßigkeiten aufweist. Das Anfangspotential (erste Ablesung) läßt sich mathematisch nicht genau extrapolieren. Als die geeignetste Zeitdauer des Durchrührens erscheinen uns etwa 4 bis 5 Sekunden, weil dann das Resultat, wie Tabelle I zeigt, mit dem Ergebnis der Wasserstoffelektrode übereinstimmt.

Tabelle IIIa. Messung nach 1- bis 3 sek. Durchrühren (Platinelektrode.)

Nr.: Durchrühren: Zeit	1 0 Millivolt	2 1 Sek. Millivolt	3 2 Sek. Millivolt	4 2 Sek. Millivolt	5 2 Sek. Millivolt	6 3 Sek. Millivolt	7 3 Sek. Millivolt
8″	145,0?	159,0?	157,5	153,0	162,0	162,0	160,0
15			162,0	157,0	168,0	165,5	163,0
30			164,0	159,0	169,0	167,0	165,0
45	161,0	168,0	166,2	160,0	170,0	168,0	166,0
1′	161,0	168,0	166,2	160,0	170,0	168,0	167,0
2	161,0	168,0	166,2	160,0	168,0	167,0	167,0
3	160,0	167,0	165,0	159,0	167,0	166,0	166,0
4	159,5	166,0	164,0	158,0	166,0	165,0	165,0
5	158,0	165,5	163,0	157,0	165,0	164,0	164,0
6	158,0	165,0	162,0	156,0	164,0	163,0	163,0
7	157,5	164,5	161,5	155,0	163,0	162,0	162,0
8	157,0	164,0	161,0	154,0	162,5	161,5	161,8

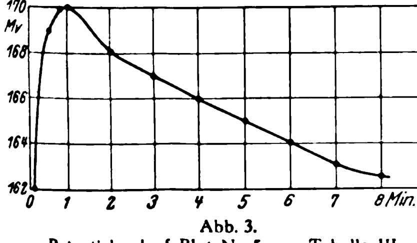


Abb. 3.
Potentialverlauf Blut Nr. 5 von Tabelle IIIa.
Nach 2 Sek. Durchrühren.

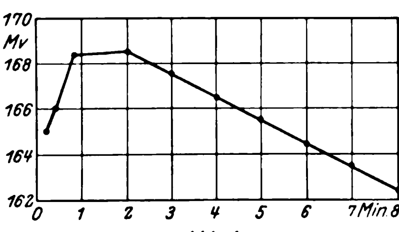


Abb. 4.
Potentialverlauf Blut Nr. 1 von Tab. IIIb.
Nach 8 Sek. Durchrühren.

Tabelle IIIb.

Messung nach 8- bis 10 sekundigem Durchrühren (Platinelektrode).

Nr.: Durchrühren: Zeit	1 8 Sek. Millivolt	2 8 Sek. Millivolt	3 8 Sek. Millivolt	4 10 Sek. Millivolt
12″	165,0	163,0	162,0	162,5
30	166,0	163,8	165,0	163,0
45	168,5	163,8	165,0	163,0
1′	168,5	163,8	165,0	163,5
2	168,5	163,8	165,0	163,5
3	167,5	162,5	164,0	162,5
4	166,5	161,8	163,0	161,5
5	165,5	160,8	162,0	160,5
6	164,5	160,0	161,0	159,5
7	163,5	159,6	160,5	158,5
8	162,5	159,0	160,0	157,5

Tabelle IIIc.

Messung nach 4- bis 5 sekundigem Durchrühren (Platinelektrode).

Nr.: Durchrühren: Zeit	1 4 Sek. Millivolt	2 4 Sek. Millivolt	3 4 Sek. Millivolt	4 4 Sek. Millivolt	5 4 Sek. Millivolt
8″	165,5	165,0	161,0	158,0	161,0
15	167,0	166,0	163,0	160,0	163,0
30	168,5	168,0	165,0	161,5	164,5
45	169,5	169,0	166,0	162,5	166,0
1′	169,5	170,0	166,0	162,5	166,0
2	169,5	170,0	165,0	162,5	166,0
3	168,5	169,0	164,0	161,5	165,0
4	167,5	168,0	163,0	160,5	164,0
5	166,5	167,0	162,0	159,5	163,0
6	165,5	166,0	161,0	159,0	162,0
7	164,5	165,0	160,5	158,5	161,0
8	163,5	164,0	159,5	158,0	160,0
8″	160,0	161,0	154,0	157,0	170,0
15	162,0	163,0	159,0	158,0	171,0
30	164,0	165,0	160,0	159,0	172,0
45	164,5	166,0	161,0	161,0	173,0
1′	165,0	166,0	161,0	164,0	173,0
2	165,0	165,0	161,0	164,0	172,0
3	164,0	164,0	160,0	163,0	170,0
4	163,0	163,0	159,0	162,0	168,0
5	161,5	162,0	158,0	161,0	167,0
6	160,5	161,0	157,0	160,0	166,0
7	159,5	160,0	156,0	159,0	165,0
8	159,0	159,0	155,0	158,0	164,0

B. Messung mit der Goldelektrode.

Nach *Kolthoff* und *E. Mislowitzer* ergibt die Goldelektrode konstantere Resultate. Unsere Ergebnisse sind die folgenden:

Tabelle IV. Potentialverlauf (Goldelektrode).
Messungen von 1 : 4 verdünntem arteriellen Vollblut.

Zeit	Nr. 1 Millivolt	Nr. 2 Millivolt	Nr. 3 Millivolt	Nr. 4 Millivolt
1/4'	167,0	153,0	176,0	169,5
1/2	168,0	154,0	177,0	170,0
3/4	168,5	156,0	178,0	171,0
1	169,0	156,0	178,0	171,0
2	169,0	156,0	178,0	171,0
3	168,5	155,0	178,0	170,0
4	168,0	154,0	177,5	169,0
5	167,5	153,0	177,0	168,0
6	166,8	152,0	176,5	166,0
7	166,5	151,0	176,0	165,0
8	166,0	150,5	175,5	164,0
9	166,0	150,0	175,0	163,0
10	165,7	149,5	174,5	162,0
11	165,5	149,0	174,5	161,5
12	165,5	148,5	174,0	161,0
13	165,5	148,0	174,0	160,8
14	165,2	147,5	173,5	160,5
15	165,0	147,0	173,0	160,0
16	164,8	146,5	172,5	159,7
17	164,5	146,0	172,0	159,3
18	164,5	145,0	171,5	159,0
19	164,0	144,5	170,0	158,8
20	164,0	144,0	170,5	158,5
21			170,5	158,3
22			170,5	158,0
23			170,0	157,5
24			170,0	157,0
25			170,0	156,5
26				156,0
27				155,5
28				155,2
29				155,0
30				154,8

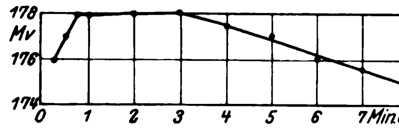


Abb. 5a. Experimentelle Kurve.
Potentialverlauf (Goldelektrode) Blut Nr. 3.

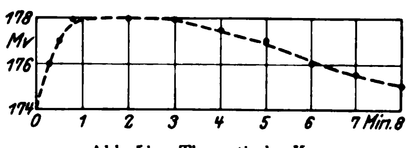


Abb. 5b. Theoretische Kurve.
Blut Nr. 3.

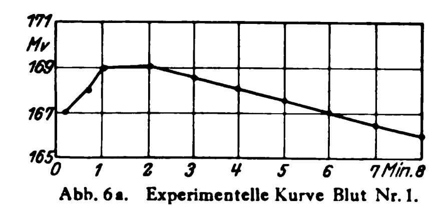


Abb. 6a. Experimentelle Kurve Blut Nr. 1.

Abb. 6b. Theoretische Kurve Blut Nr. 1.



Tabelle IV. Das Resultat zeigt, daß der Potentialanstieg das Maximum meist in den ersten 45 Sekunden erreicht. Bei der dritten und vierten Minute beginnt das Potential wieder abzufallen. Alle Verläufe sind ziemlich regelmäßig. Die Potentialsprung- und die Abfallsgeschwindigkeit sind nicht so übertrieben wie bei der Platinelektrode. Es ist zweifellos, daß die Goldelektrode viel konstantere Resultate gibt. Daraus kann man schließen, daß in dieser Hinsicht die Goldelektrode für die Messung der Wasserstoffionenkonzentration im Blute wohl besser geeignet ist.

Die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration in bezug auf die Potentialverläufe.

Da das Potential sich in umgekehrtem Verhältnis zur Wasserstoffionenkonzentration verändert, hat die Veränderung im Potential folgende Bedeutung: Während des Potentialsprungs verringert sich die Wasserstoffionenkonzentration mit dem Zeitverlauf immer mehr, so daß die Reaktion alkalischer wird. Bei konstantem Maximumpotential bleibt die $[H^{\cdot}]$ kurze Zeit unverändert. Während des Potentialabfalls dagegen erhöht sich die Wasserstoffionenkonzentration der Zeit entsprechend.

Die Bedeutung des Potentialverlaufs für die Messung der Wasserstoffionenkonzentration.

Das Chinhydronpotential der Platinelektrode stellt einen bestimmten, ziemlich konstanten Verlauf dar. Der Potentialanstieg erreicht das Maximum spätestens am Ende der ersten Minute. Das Maximumpotential bleibt nur 1 bis 2 Minuten konstant. Spätestens bei der vierten Minute beginnt das Potential abzufallen.

Wir haben weitere Untersuchungen des arteriellen Blutes durch Punktion der linken Herzkammer in Intervallen von 5 bis 10 Minuten gemacht; der Verlauf war bei manchen genau der gleiche. Das Maximumpotential blieb gleichfalls unverändert.

Daraus läßt sich schließen, daß der Potentialverlauf sich nicht sehr verändert, wenn die Blutreaktion keine Veränderung zeigt. Das Anfangspotential stellt sich als die wahre Messung der aktuellen Reaktion des Blutes dar, während das Maximumpotential nicht die aktuelle Reaktion, sondern eine Reaktion des Blutes mit dem auftretenden Methämoglobin aufzeigt. Infolge der bedeutenden Geschwindigkeit des Potentialanstiegs ist der Anfangswert nicht leicht ablesbar. Da der Potentialanstieg solche Schwankungen ergibt und die Reaktionsgeschwindigkeit je nach Zeitverlauf so verschieden ist, auch die Verlaufskurve des Potentials von einem Punkt zum anderen so verschieden gerichtet ist, kann man das Anfangspotential nicht genau

extrapolieren. Nach wiederholter Messung derselben Blutprobe läßt sich das Anfangspotential ziemlich genau ablesen.

Die theoretische Erklärung der Potentialverläufe.

G. E. Cullen und *Biilmann* führten die Potentialschwankungen auf die Gegenwart von Hämoglobin zurück, das sich während der Messung in Methämoglobin umwandelt. Nach *Mozołowski* und *Parnas* wird „infolge der vollständigen Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin nicht nur das Gleichgewicht der Basen und Säuren im Blute, sondern auch das Verhältnis des Chinons zum Chinhydron völlig verschoben“.

Diese Theorien jedoch sind einseitig und nicht imstande, die Gesamtveränderung zu erklären. Unsere Ansichten hierüber sind folgende: Die chemischen Reaktionen des Chinhydrons im Wasser sind:

$$C_6H_4O_2 + 2\,H^{\cdot} + 2\,\ominus \rightleftarrows C_6H_4(OH)_2 \qquad (3)$$

$$C_6H_4(OH)_2 + C_6H_4O_2 \rightleftarrows C_6H_4(OH)_2C_6H_4O_2,$$

$$\frac{[C_6H_4O_2]\,[H^{\cdot}]^2}{[C_6H_4(OH)_2]} = K. \qquad (4)$$

Während des Potentialanstiegs finden hauptsächlich folgende chemische Veränderungen in der Mischung von Blut und Chinhydron statt:

1. Durch mechanische und chemische Störungen wird das Oxyhämoglobin $HHbO_2$ in Methämoglobin

$$2\,HHbO_2 \rightleftarrows 2\,HbOH + O_2$$

umgewandelt.

Der Zusammenstoß zwischen den chemischen Bestandteilen des Blutes und des Chinhydrons ergibt ferner die folgenden Reaktionen:

$$C_6H_4(OH)_2 + O_2 \rightleftarrows C_6H_4O_2,$$

$$C_6H_4(OH)_2 + O'' + 2\,\text{[illegible]} \rightleftarrows C_6H_4O_2 + H_2O, \qquad (5)$$

$$\frac{[C_6H_4(OH)_2]\,[O'']}{[C_6H_4O_2]} = K_1, \qquad (6)$$

$$[C_6H_4(OH)_2] = \frac{[C_6H_4O_2]\,K_1}{[O'']}$$

Setzt man dies in Gleichung (4) ein, so folgt:

$$\frac{[C_6H_4O_2]\,[H^{\cdot}]^2}{\dfrac{[C_6H_4O_2]\,K_1}{[O'']}} = \frac{[H^{\cdot}]^2\,[O'']}{K_1} = K. \qquad (7)$$

Mit anderen Worten ist

$$\frac{(\text{reduzierende Stoffe})\ (\text{oxydierende Stoffe})}{K_1} = K.$$

Dies bedeutet, daß bei Vermehrung der oxydierenden Stoffe die reduzierenden Stoffe sich proportional vermindern, und umgekehrt. Da das Potential umgekehrt proportional zur Wasserstoffionenkonzentration ist, wird die Reduktion der Wasserstoffionen in der zu messenden Lösung eine Erhöhung des Potentials bewirken. Während des Stadiums des Maximumpotentials befinden sich die Reduktions- und die Oxydationsvorgänge im Gleichgewicht; so bleibt das Potential einige Minuten konstant.

2. Ein anderer Faktor ist der, daß das reduzierte Hämoglobin als Säure schwächer als Oxyhämoglobin ist. Nach *Hasselbalch* soll eine partielle Reduktion von Blut im Körper das p_H um ungefähr 0,02 erhöhen. Diese Veränderungen sind für den Potentialanstieg hauptsächlich verantwortlich.

Wie kann man den Potentialabfall erklären?

Die Beantwortung dieser Frage ist sehr schwierig. Mehrere Faktoren außer den Oxydations-Reduktionsvorgängen kommen dabei in Betracht.

1. *Austreten des Zelleninhalts.* Durch die chemische und mechanische Durchmischung wird nicht allein die Zerstörung des Osmoseverhältnisses, der Ionenverteilung, des Zellenmembranpotentials und des Kolloidzustandes sofort bewirkt, sondern es tritt auch der Zelleninhalt in die Flüssigkeit ein.

Nach *van Slyke* und seinen Mitarbeitern beträgt das Alkali (Na) bei p_H 7,4, gebunden an 1 g Molekeln von rekristallisiertem Pferdeoxyhämoglobin, $2{,}15 \pm 0{,}10$ Äquivalente, von reduzierendem Hämoglobin aber nur $1{,}47 \pm 0{,}08$ Äquivalente. Wenn das Blut vollständig hämolysiert ist, gelangt eine gewisse Menge der Kationen $K^{\cdot}$ und Na in Freiheit. Die bedeutende Vermehrung dieser Kationen in der Lösung wird die Wasserstoffionenaktivität herabsetzen.

Nach *L. J. Henderson* ist $p_{H_z} = p_{H_s} + \log r$, wo Subschrift z und s Blutzellen und Serum bedeutet.

Wenn $\log r = 0{,}71$ ist, wird $p_{H_s} = 7{,}45$ und $p_{H_z} = 7{,}30$. Es bestätigt sich somit, daß der Inhalt der Blutzellen saurer ist als Serum, und der Unterschied bei normalem Blut um p_H 0,15 beträgt. Falls die Blutkörperchen vollständig hämolysiert sind, tritt dieser saure Blutzelleninhalt aus. Die gesamte Reaktion erscheint demgemäß saurer. Da auch ferner aus Blutzellen Pufferstoff austritt, wird die Wasserstoffionenkonzentration auch hierdurch wiederum beeinflußt.

van Slyke und seine Mitarbeiter berichteten, daß das Hämoglobin im oxydierten Blute für durchschnittlich 76 % der „Gesamtpufferung" verantwortlich sei, das Bicarbonat dagegen nur für 6,9 %. Im reduzierten Blute sei reduziertes Hämoglobin nur für 73,3 % der „Gesamtpufferung", Bicarbonat hingegen für 9 % verantwortlich. Die Pufferung des Serums

ist viel geringer als bei Blutzelleninhalt. Als Folge von Zerstörung und Hämolyse des Blutes zeigt sich Erhöhung der Pufferung in der Lösung.

2. *Gerinnung.* Nach wiederholten Beobachtungen erfolgt in der zu messenden Mischung von Blut, physiologischer Kochsalzlösung und Chinhydron in den ersten 2 bis 3 Minuten keine Gerinnung, die vielmehr erst kurz nach der Periode des Maximumpotentials eintritt. Daher sind diese Gerinnungsvorgänge an dem Potentialanstieg nicht beteiligt, sondern üben nur einen gewissen Einfluß auf den Potentialabfall aus. *E. F. Hirsch* berichtet, daß durch die Gerinnung des Kaninchenplasmas eine Erniedrigung der p_H, gemessen mit Spektrophotometer und Kresolrot als Indikator, um durchschnittlich 0,09 eintritt. Daraus kann man schließen, daß auch Gerinnung zum Potentialabfall bis zu gewissem Grade beiträgt.

3. Andererseits hat der Oxydationsvorgang vielleicht noch eine andere Wirkung auf das Chinhydron. Es ist auch möglich, daß dieses durch eine Oxydation organische Säure produziert. Ferner läßt sich die Möglichkeit nicht ausschließen, daß Hydrochinon als schwache Säure wirkt und (OH′) aufnimmt, wodurch sich eine zu hohe Wasserstoffionenkonzentration finden würde.

Nimmt man die hauptsächlichsten Faktoren zusammen, so lassen sich die Potentialverläufe im wesentlichen auf chemische Veränderungen des Blutes in der Chinhydronelektrode zurückführen. Vor allem aber gibt es noch einen anderen Faktor (Sättigungsvorgänge), den man für den ganzen Potentialverlauf als Veränderungsbasis ansehen muß und dem wir in unserer nachfolgenden Mitteilung näherzukommen versuchen werden.

Zusammenfassung.

1. Die Wasserstoff- und die Chinhydronelektrode ergeben einen Unterschied von p_H 0,01 bis 0,04.

2. Das 1 : 4 verdünnte Vollblut, durch Punktion der linken Herzkammer gewonnen, zeigt immer einen bestimmten regelmäßigen Verlauf der Chinhydronpotentiale bei Benutzung der Platinelektrode, d. h. einen Anstieg von Beginn bis zum Maximum in der ersten Minute, dann eine Konstanz des Maximumpotentials für 1 bis 2 Minuten, und danach einen allmählich immer langsamer werdenden Potentialabfall, anfangend gewöhnlich zwischen der zweiten und dritten Minute, um ungefähr 1 Millivolt pro Minute.

3. Der Potentialverlauf stellt sich nicht nur als Potentialveränderung, sondern auch als die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit verwickelter chemischer Reaktionen dar.

4. Die Goldelektrode ergibt konstantere Resultate für gleich verdünntes Vollblut, die sich durch die Eigenschaften des Metalls erklären lassen.



5. Die hauptsächlichsten chemischen Veränderungen sind angeführt worden, mit denen man schon den Potentialverlauf des verdünnten Blutes größtenteils erklären kann.

Zum Schluß sage ich Herrn Privatdozent Dr. *Ernst Herzfeld* für Instruktion und rege Anteilnahme, wie für Lieferung des Materials, Herrn Dr. *R. Krüger* für freundliche Hilfeleistungen, sowie Herren Prof. Dr. *Freundlich* und Dr. *G. Ettisch* für Richtigstellung von Begriffen über die Potentialverläufe, auch für Anregung betreffs Sättigungsvorgänge des Chinhydrons meinen besten Dank.

Literatur.

J. W. Corran und *W. C. Mc. C. Lewis*, Biochem. Journ. 1924, S. 1358. – *G. E. Cullen* und *E. Biilmann*, Journ. of biol. Chem. **1925**, S. 727. – *J. M. Kolthoff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **144**, 259, 1925. – *R. Schaefer* und *F. Schmidt*, diese Zeitschr. **156**, 63, 1925. – *R. Schaefer*, ebendaselbst 166 bis 167, **433**, 1925. – *W. Mozolowski* und *J. K. Parnas*, ebendaselbst **168**, 9, 1926. – *H. Meeker* und *B. L. Oser*, Journ. of Biol. Chem. **67**, 307, 1926. – *E. Mislowitzer*, diese Zeitschr. **159**, 72, 1925. – *Derselbe*, ebendaselbst **159**, 68, 1925. – *Derselbe*, ebendaselbst **159**, **77**, 1925. – *Derselbe*, Klin. Wochenschr. 1926. – *H. Runge* und *O. Schmidt*, Deutsch. med. Wochenschr. 1926, S. 2077. – *Schau-Kuang Liu*, Über die Regulation der Wasserstoffionenkonzentration im Blute. Einführung in die Gasketten- und Chinhydronkettentheorie und in die physiko-chemische Regulierung der Wasserstoffionenkonzentration im Blute. Dissertation Berlin 1927. *Schau-Kuang Liu* und *R. Krüger*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Medizin 1927. – *J. H. Austin*, *G. E. Cullen*, *A. B. Hastings*, *F. C. McLean*, *J. P. Peters* und *D. D. van Slyke*, Journ. of Biol. Chem. **54**, 121, 1922. – *D. D. van Slyke*, *A. B. Hastings*, *M. Heidelberger* und *J. M. Neill*, ebendaselbst 1922, S. 481. – *D. D. van Slyke*, *A. B. Hastings* und *J. M. Neill*, ebendaselbst 1922, S. 507. – *D. D. van Slyke*, *Hsien-Wu* und *F. C. McLean*, ebendaselbst **56**, 765, 1923. – *L. J. Henderson*, *A. V. Bock*, *H. J. Field* und *J. L. Stoddard*, ebendaselbst **59**, 379, 1924. – *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration 1922 (Springer). – *Derselbe*, Praktikum der physikalischen Chemie 1926. – *W. Ostwald*, Lehrbuch der allgemeinen Chemie. I, 1911. – *W. Nernst* und *A. Schoenfliess*, Einführung in die mathematische Behandlung der Naturwissenschaften 1923. – *G. Ettisch* und *W. Beck*, diese Zeitschr. **172**, 1, 1926. – *E. F. Hirsch*, Journ. of Biol. Chem. **61**, **795**, **1924**.

Über die Regulation der Wasserstoffionenkonzentration im Blute.

II. Mitteilung:

Studien über den Einfluß der Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge des Chinhydrons auf den Potentialverlauf des Blutes.

Von

Schau-Kuang Liu (China).

(Aus der III. Medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 2. April 1927.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Chinhydron ist in Wasser, wie auch in physiologischer Kochsalzlösung schwer löslich. Die langsamen Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge in destilliertem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung ergeben einen eigenartigen Potentialverlauf, der selbstverständlich durch die chemische Reaktion mit den Bestandteilen und Elementen des Blutes verändert wird. Die Beziehungen zwischen diesem Potentialverlauf der Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge des Chinhydrons und dem des normalen Blutes bei Benutzung der Chinhydronelektrode sind sehr verwickelt. Die folgenden Untersuchungen sollen das Verhältnis zwischen den Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgängen einerseits und den chemischen Veränderungen des normalen Blutes andererseits klären helfen.

Tabelle I zeigt, daß der Auflösungs- bzw. Sättigungsverlauf des Chinhydrons in physiologischer Kochsalzlösung sehr erheblich schwankend ist, einen sehr schnellen Potentialanstieg, konstantes Maximumpotential für einige Minuten, und schließlich einen allmählich immer langsameren Potentialabfall zeigt. In manchen Fällen tritt der Potentialabfall bis zum Ende der ersten 25 Minuten noch nicht auf. Die Potentialverläufe stimmen nicht miteinander überein. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist von der Menge des gelösten Stoffes abhängig. Daher beschleunigt mechanisches Durchrühren die Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge. Rührt man die Mischung länger als ½ Minute durch, so wird der Potentialverlauf nicht wesentlich beeinflußt. In

destilliertem Wasser ist der Potentialverlauf des Chinhydrons gleichfalls schwankend, so daß er nur schwer und ungenau meßbar ist.

Tabelle I.

Die Auflösungs- bzw. Sättigungspotentialverläufe des Chinhydrons in physiologischer Kochsalzlösung.

Nr.: Durchrühren: Zeit	1 15 Sek. Millivolt	2 15 Sek. Millivolt	3 30 Sek. Millivolt	4 30 Sek. Millivolt	5 1 Min. Millivolt	6 1 Min. Millivolt	7 2 Min. Millivolt	8 3 Min. Millivolt
1/4′	—	0	—	0	—	—	—	—
1/2	13	3	18	2,0	9	15	5,0	15,0
3/4	14	5	19	3,0	—	—	5,5	15,5
1	14	8	20	4,0	13	19	6,0	16,0
2	34	8	21	5,0	14	22	7,0	17,0
3	35	9	22	5,5	15	25	8,0	20,0
4	40	9,5	22	6,0	17	26	9,0	20,0
5	45	10	22	6,5	17	27	9,5	21,0
6	46	10	22	8,0	17	28	10,5	22,0
7	46	10	22	10,0	17	28	12,0	23,0
8	47	10	22	12,0	17	28	13,0	24,0
9	47	10	22	14,0	17,5	28	14,0	24,0
10	47	10	22	15,0	18,0	28	14,0	25,0
11	47	10	22	15,5	18,0	28	14,0	25,0
12	47	10	22	16,0	16,5	28	14,0	25,0
13	47	10	22	17,0	16,5	26,5	14,0	25,0
14	47	10	22	17,0	15,0	25,0	13,0	26,0
15	47	10	—	17,0	15,0	24,0	12,0	26,0
16	47	10	—	17,0	14,7	23,0	11,5	26,0
17	47	10	—	17,0	14,3	22,0	11,5	26,0
18	47	10	—	17,0	13,5	21,0	11,5	26,0
19	47	10	—	17,0	13,0	20,5	11,5	26,0
20	47	10	—	17,0	12,5	20,3	11,5	26,0

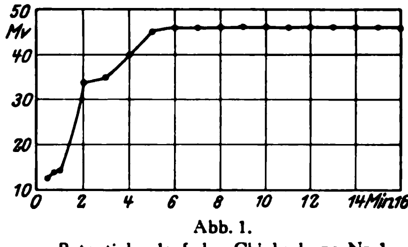


Abb. 1.
Potentialverlauf des Chinhydrons Nr. 1.
Nach 15 Sek. Durchrühren.

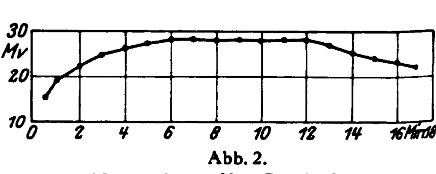


Abb. 2.
Nr. 6. Nach 1 Min. Durchrühren.

Der Einfluß des Puffergemisches auf den Potentialverlauf der Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge.

Am meisten interessiert uns das Verhältnis zwischen Puffergemisch und Potentialverlauf der Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge. Unsere folgenden Untersuchungen sollen den Einfluß des Puffergemischs auf die Auflösungs- bzw. Sättigungsverläufe darlegen.

Tabelle II zeigt, daß ein Zusatz von Phosphatgemisch von p_H 6,86, also 1 : 10 Verdünnung, den Auflösungs- bzw. Sättigungsverlauf beträchtlich vermindert oder auch verhindert. Ist das Phosphatgemisch mit physiologischer Kochsalzlösung nicht über 1 : 20 verdünnt, so kann man schon nach wiederholten Messungen angenäherte Anfangspotentiale (erste Ablesung) bekommen. Durch weitere Verdünnung wird der Potentialverlauf schwankender und das Potential immer mehr erniedrigt.

Tabelle II.

Potentialverläufe des Phosphatgemisches (Platinelektrode) (primäres m/15 1 Teil und sekundäres m/15 2 Teile).

Verdünnung: Durchrühren: Zeit	1 : 2 6 Sek. Millivolt	1 : 2 7 Sek. Millivolt	1 : 4 15 Sek. Millivolt	1 : 10 15 Sek. Millivolt	1 : 10 15 Sek. Millivolt	1 : 20 15 Sek. Millivolt	1 : 40 15 Sek. Millivolt	1 : 50 15 Sek. Millivolt
$^1/_2$′	115	115	112	110	109	110	107,0	100,0
1	115	115	112	110	109	110	100,0	95,5
2	115	115	112	110	109	110	100,0	98,0
3	115	115	112	110	109	110	98,0	97,5
4	115	115	112	110	109	109	97,5	97,0
5	115	115	112	109	108	109	96,5	96,5
6	115	115	112	109	108	109	96,0	96,0
7	115	115	112	109	108	109	95,0	95,5
8	115	114,8	112	109	108	109	94,0	95,0
9	115	114,8	112	109	108	109	94,0	95,0
10	115	114,8	112	109	107	109	93,0	94,5

Verdünnung: Durchrühren: Zeit	1 : 75 15 Sek. Millivolt	1 : 100 15 Sek. Millivolt	1 : 400 15 Sek. Millivolt	1 : 400 15 Sek. Millivolt	1 : 1000 15 Sek. Millivolt	1 : 2000 15 Sek. Millivolt	1 : 2000 15 Sek. Millivolt
$^1/_2$′	101,0	97,0	10	8	15,0	14,0	9,0
1	100,0	91,0	19	14	15,0	15,0	13,5
2	98,0	89,0	21	14	15,0	16,0	13,5
3	97,5	88,0	21	18	15,0	16,0	13,5
4	97,0	87,0	21	18	15,0	16,0	14,8
5	96,5	86,0	21	18	16,0	16,0	14,8
6	96,0	85,5	20	18	16,2	16,5	14,8
7	95,5	85,5	20	18	16,2	16,5	14,8
8	95,3	85,0	20	18	16,2	16,5	14,8
9	95,3	85,0	19	18	16,2		14,8
10	95,0	85,0	19	18	15,0		14,3

Tabelle III zeigt ähnliches Resultat wie die vorige Tabelle. Das Phosphatgemisch hat einen p_H von 6,97.



Tabelle III.

Potentialverläufe des Phosphatgemisches (Platinelektrode) (primäres m/15 1 Teil und sekundäres m/15 4 Teile).

Verdünnung: Durchrühren: Zeit	1 : 2 15 Sek. Millivolt	1 : 20 15 Sek. Millivolt	1 : 40 15 Sek. Millivolt	1 : 200 15 Sek. Millivolt
1/4'	128	113,3	112,5	81,3
1/2	128	113,3	112,5	81,3
1	128	113,3	111,0	79,0
2	128	113,3	108,0	76,0
3	128	113,3	106,0	73,0
4	128	113,3	104,5	72,5
5	128	113,3	104,5	71,8
6	128	113,3	104,5	70,5
7	128	113,3	104,0	69,0
8	128	113,3	104,0	68,5
9	128	113,3	104,0	68,0
10	128	113,3	103,7	67,5

Tabelle IV macht ersichtlich, daß der Verlauf durch Zusatz von Phosphatgemisch, p_H 7,28, also einer Verdünnung von 1 : 20, erheblich vermindert bzw. verhindert wird. Weitere Verdünnung vergrößert den Potentialabtrieb und erniedrigt allmählich das Potential.

Tabelle IV.

Potentialverläufe des Phosphatgemisches (Platinelektrode) (primäres m/15 1 Teil und sekundäres m/15 8 Teile).

Verdünnung: Durchrühren: Zeit	1 : 2 15 Sek. Millivolt	1 : 2 15 Sek. Millivolt	1 : 4 15 Sek. Millivolt	1 : 20 15 Sek. Millivolt	1 : 40 15 Sek. Millivolt
1/4'	146,5	147			124,0
1/2	146,5	147	152	128,0	122,0
1	146,5	146,5	152	127,0	119,0
2	146,5	146,5	152	126,0	118,0
3	146,5	146,5	152	126,0	117,0
4	146,5	146,5	152	126,0	116,0
5	146,5	146,5	152	125,0	115,0
6	146,5	146,5	152	125,0	114,0
7	146,5	146,5	152	124,5	113,5
8	146,5	146,5	152	124,0	113,0
9	146,5	146,5	152	124,0	112,5
10	146,5	146,5	152	124,0	112,0

Tabelle V. Das Phosphatgemisch hat ein p_H von 7,69. Hier ist das Potential nicht mehr so konstant. In 1 : 2- und 1 : 4-Verdünnungen ist nur eben ein geringer Potentialabfall vorhanden. Bei 1 : 20-Verdünnung ist der Potentialabfall weit größer und das Potential wesentlich erniedrigt.

Tabelle V.

Potentialverläufe des Phosphatgemisches (primäres m/15 1 Teil und sekundäres m/15 16 Teile).

	Mit Wasser	Mit physiologischer Kochsalzlösung			
Verdünnung:	1 : 2	1 : 2	1 : 4	1 : 20	1 : 200
Durchrühren:	10 Sek.	15 Sek.	15 Sek.	15 Sek.	15 Sek.
Zeit	Millivolt	Millivolt	Millivolt	Millivolt	Millivolt
1/4′		160	156	141,8	90,0
1/2	162,3	160	156	140,5	85,0
1	162,3	160	156	139,0	82,0
2	162,3	160	156	137,0	79,0
3	162,3	160	156	137,0	78,0
4	162,3	160	155	137,0	76,0
5	162,0	160	155	136,0	75,0
6	162,0	160	155	136,0	74,0
7	161,0	159	155	136,0	73,5
8	161,0	159	155	136,0	73,0
9	161,0	159	155	135,0	72,5
10	160,0	159	155	135,0	72,0

Tabelle VI. Das Phosphatgemisch hat ein p_H von 7,99. Der Potentialabtrieb in 1 : 2- und 1 : 4-Verdünnung ist noch größer. Die Anfangspotentiale (ersten Ablesungen) stimmen nicht ganz miteinander überein. Weitere Verdünnung ergibt noch größere Schwankungen.

Tabelle VI.

Potentialverläufe des Phosphatgemisches (primäres m/15 1 Teil und sekundäres m/15 32 Teile).

Verdünnung:	1 : 2	1 : 4	1 : 20
Durchrühren:	15 Sek.	15 Sek.	15 Sek.
Zeit	Millivolt	Millivolt	Millivolt
1/4′	171		135,0
1/2	170	164,0	134,0
1	169	163,5	133,0
2	169	163,0	131,0
3	169	163,0	130,5
4	169	163,0	130,0
5	169	163,0	129,5
6	169	163,0	129,0
7	168	163,0	128,5
8	168	163,0	128,0
9	168	163,0	127,5
10	168	163,0	127,0

Tabelle VII. Der Harn hat ein p_H von 6,15. Er ist mit destilliertem Wasser verdünnt. Bei 1 : 2- und 1 : 4-Verdünnungen ist das Potential fast konstant und die beiden Werte bleiben ungefähr dieselben. Bei 1 : 200-Verdünnung zeigt sich schon ein bedeutender Potentialabfall und ein wieder stark erniedrigtes Potential.

Tabelle VII.
Potentialverläufe des Harns.

Verdünnung: Durchrühren: Zeit	1 : 2 15 Sek. Millivolt	1 : 4 15 Sek. Millivolt	1 : 200 15 Sek. Millivolt	1 : 200 15 Sek. Millivolt
1/4′	104,5	104		83,0
1/2	104,5	104		
1	104,5	104	87,5	82,5
2	104,5	104	85,5	82,0
3	104,5	104	84,5	80,0
4	104,5	104	84,0	78,0
5	104,5	103	83,5	77,0
6	104,5	103	83,0	76,0
7	104,0	103	83,0	75,0
8	104,0	103	83,0	74,0
9	104,0	103	83,0	73,0
10	104,0	103	83,0	72,0

Zusammenfassend kann man folgendes darlegen: 1. Kleine Mengen von Phosphatgemisch der m/15 Lösung, oder auch andere Puffergemische können die Auflösungs- bzw. Sättigungspotentialverläufe erheblich vermindern bzw. verhindern.

2. Wenn die zu messende Lösung stark gepuffert ist, ergeben sich nur wenige Potentialveränderungen und das Potential bleibt nach wiederholten Messungen dasselbe.

3. Je saurer die zu messende Lösung ist, um so geringer ist die Potentialveränderung und um so weniger Phosphatgemisch und anderes Puffergemisch ist vonnöten, um eine Potentialveränderung ganz zu verhindern, und umgekehrt.

4. Die Pufferwirkung des Phosphatgemisches und Harns ist viel geringer als die des Vollbluts. Da das Gesamtpuffergemisch im Blute auch 0,04% Gesamtphosphat enthält, an welchem zusammen mit Eiweißstoffen usw. (außer Hämoglobin und Bicarbonat) 17,1% der Gesamtpufferung des Blutes teilnehmen (*van Slyke* usw.), so läßt sich annehmen, daß schon die Gesamtpufferung allein den Auflösungs- bzw. Sättigungsverlauf verhindern kann. Chinhydron ist in einer Kolloidlösung wie Blut noch schwerer löslich. Setzen wir einer gesättigten Chinhydronlösung Blut zu und durchrühren mit der Platinelektrode, so werden Diffusionsvorgänge stattfinden. Weitere Auflösungs- und Sättigungsvorgänge können vielleicht auch den Potentialverlauf bis zu gewissem Grade veranlassen.

Der Einfluß der Verdünnung auf den Potentialverlauf.

Durch immer weitere Verdünnung der Blutproben wird nicht nur das Gesamtpuffergemisch vermindert, sondern es treten auch die Auflösungs- bzw. Sättigungspotentialverläufe des Chinhydrons auf. Andererseits werden die vorhandenen Faktoren, wie Sauerstoff, katalytische Reaktionen, die Potentialveränderungen so beschleunigen, daß man sie nicht genau ablesen kann.

Tabelle VIII. Der Potentialverlauf des unverdünnten Vollblutes ist sehr unbedeutend und langsam. Durch 1 : 4-Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung wird er beschleunigt und vergrößert. Weitere Verdünnung gestaltet nicht nur den Potentialverlauf immer schwankender, sondern erniedrigt auch das Potential verhältnismäßig.

Tabelle VIII.

Nr.: Verdünnung: Durchrühren: Zeit	1 Vollblut 15 Sek. Millivolt	2 Vollblut 10 Sek. Millivolt	3 1 : 4 6 Sek. Millivolt	4 1 : 10 5 Sek. Millivolt
1/4′	177,0	175,0	160,0	146,0
1/2	179,0	176,0	163,0	151,0
1	180,0	176,0	165,0	151,5
2	180,0	176,5	165,0	151,5
3	180,0	177,0	164,0	151,5
4	180,0	177,0	163,0	150,5
5	180,0	177,0	161,5	149,5
6	180.5	177,0	160,5	148,8
7	180,5	177,0	159,5	148,0
8	181,0	177,0	159,0	148,0
9	181.0	177,5	158,5	147,8
10	181,0	177,5	158,0	147,5
11	181,0	177,5		
12	181,0	177,5		
13	181,5	177,5		

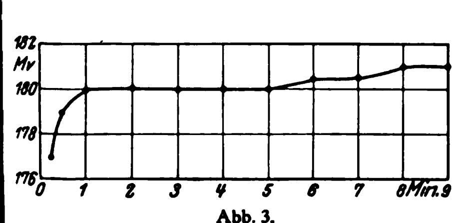


Abb. 3.
Potentialverlauf des Vollblutes Nr. 1.
Nach 15 Sek. Durchrühren.

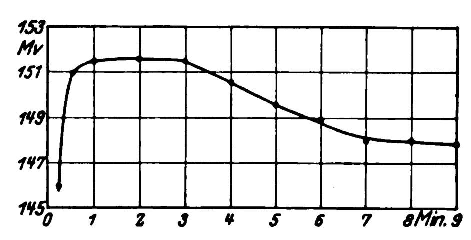


Abb. 4.
Potentialverlauf des 1 : 10 mit 0,85 % NaCl verdünnten Blutes. Nr. 4.
Nach 5 Sek. Durchrühren.

Zusammenfassend kann man hierdurch sowohl die chemischen Veränderungen, wie auch den Potentialverlauf des Blutes erklären: Der Potentialverlauf stellt die Geschwindigkeit komplizierter chemischer Reaktionen dar und sieht auch tatsächlich wie eine gewöhnliche chemische Reaktionskurve aus, das ist eine Kurve mit steilem Anstieg und allmählichem, langsamem Abfall. Der Auflösungs- bzw. Sättigungspotentialverlauf des Chinhydrons wird durch das Gesamtpuffergemisch des Blutes beträchtlich vermindert bzw. verhindert. Der Chinhydronpotentialverlauf des Blutes wird wahrscheinlich durch Wirkung der vorerwähnten Faktoren, wie Oxydations-Reduktionssysteme, Veränderungen in den Blutzellen, katalytische Reaktionen usw., auf das leicht veränderliche Chinhydron in der Lösung, sowie auf die zugehörigen Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge verursacht.

Literatur.

Schau-Kuang Liu, diese Zeitschr. **185**, 242, 1927.

Über die Regulation der Wasserstoffionenkonzentration im Blute.

III. Mitteilung:

Studien über die Natur der verschiedenen Potentialverläufe von Serum, Plasma, Blutkörperchensuspensionen und Hämoglobinlösung bei Benutzung der Chinhydronelektrode.

Von

Schau-Kuang Liu (China).

(Aus der III. Medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 2. April 1927.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Der Potentialverlauf hängt hauptsächlich von den Eigenschaften der zu messenden chemischen Blutbestandteile ab. Daher variiert er je nach der Zusammensetzung der Blutprobe. Will man die verschiedenen Einzelteile des Blutes, wie Serum, Blutzellen und Hämoglobinlösung, messen, so findet man je nach Umständen verschiedene Abweichungen vom normalen Potentialverlauf des arteriellen Blutes.

Nach dem Prinzip der elektrometrischen Messungen der Wasserstoffionenkonzentration ist der Potentialunterschied umgekehrt proportional zur Wasserstoffionenkonzentration in der zu messenden Lösung. Je kleiner die Wasserstoffionenkonzentration war, desto größer wird der Potentialunterschied sein.

Andererseits ist die Potentialveränderung von der Wasserstoffionenkonzentration in der zu messenden Flüssigkeit abhängig. In der ersten Mitteilung haben wir bereits dargestellt, daß die Potentialveränderungen bzw. -verläufe als Gesamtreaktionsgeschwindigkeit der Verschiebung der $[H^{\cdot}]$ betrachtet werden können. Hieraus folgt ganz deutlich, daß die Geschwindigkeit der Potentialveränderung in jedem Augenblick direkt proportional zur Geschwindigkeit der Verschiebung (Vermehrung oder Verminderung) der Wasserstoffionenkonzentration ist; d. h. wenn die Wasserstoffionenkonzentration ganz schnell in der betreffenden Lösung abnimmt, wird das Potential auch verhältnismäßig ebenso schnell ansteigen, und umgekehrt.

Alle chemischen Stoffe, die, wie der Sauerstoff, die Wasserstoffionenkonzentration in der Chinhydronelektrode ganz schnell vermindern, werden einen Potentialanstieg verursachen. Je nach den

Umständen wird der Potentialanstieg von der Menge dieser chemischen Stoffe abhängig sein. Andererseits wird die Potentialveränderung vermindert bzw. verhindert, wenn die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration nach der sauren oder alkalischen Seite hin verkleinert bzw. verhindert wird. Alle die chemischen Stoffe, die regulatorische, hemmende oder moderierende Wirkung gegenüber der Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration ausüben, werden die Potentialveränderung vermindern bzw. verhindern, je nach der Menge und auch Wirkungsstärke der betreffenden Stoffe. Das Potential verändert sich daher unter gewissen Bedingungen umgekehrt mit der Gegenwirkung der Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration.

In einfachster Gestalt kann man so formulieren:

$$\text{Potentialveränderung} = \frac{\text{Verschiebung der } [H^{\cdot}]}{\text{Gegenverschiebung der } [H^{\cdot}]}.$$

Die Potentialveränderung vergrößert sich mit der Verschiebung der $[H^{\cdot}]$ und verkleinert sich mit der Gegenverschiebung der $[H^{\cdot}]$. Solange die Reaktionen für die Verschiebung der $[H^{\cdot}]$ überwiegen, findet eine Potentialveränderung statt. Wenn die Faktoren gegen die Verschiebung der $[H^{\cdot}]$ außerordentlich groß sind, wird die Verschiebung der $[H^{\cdot}]$ nicht auftreten und das Potential bleibt konstant.

Die Geschwindigkeit der Potentialveränderungen kann man auch in bezug auf die Verschiebung und Gegenverschiebung der $[H^{\cdot}]$ kurz formulieren: Die Geschwindigkeit der Potentialveränderung ist von der Geschwindigkeit der chemischen Reaktionen für und gegen die Verschiebung der $[H^{\cdot}]$ abhängig. Sie verändert sich direkt mit der Verschiebungsgeschwindigkeit der $[H^{\cdot}]$. Da diese letztere wieder durch die chemischen Reaktionen gegen die Verschiebung beeinflußt, d. h. verlangsamt bzw. verhindert wird, so verändert sich die Geschwindigkeit der Potentialveränderungen auch danach. In einer zu messenden Lösung, wie Blut, Serum, Plasma und anderen Gewebsflüssigkeiten, wo viele Faktoren für und gleichzeitig solche gegen die Verschiebungen der $[H^{\cdot}]$ und vielleicht auch katalytische und antikatalytische Reaktionen vorhanden sind, wird sich das Potential in jedem Augenblick mit den chemischen Reaktionen verändern. Die Geschwindigkeit der Potentialveränderung ist daher die Folge der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit für und gegen die Verschiebungen der $[H^{\cdot}]$.

Da das Chinhydron in destilliertem Wasser und physiologischer Kochsalzlösung schon einen so schwankenden Potentialverlauf der Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge ergibt, kann man den Einfluß der chemischen Reaktionen gegen die Verschiebungen der $[H^{\cdot}]$ nicht genau nachweisen.

Schon unsere Ergebnisse in der vorigen Mitteilung haben gezeigt, daß Zusatz von Phosphatgemisch den Potentialverlauf und die Re-

aktionsgeschwindigkeit der Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge des Chinhydrons bedeutend vermindern bzw. verhindern kann. Unter gewissen Umständen wirkt eine große Menge des Phosphatgemisches stärker als eine kleine.

Nach *M. Koppel* und *K. Spiro* hat das Puffergemisch die Fähigkeit, nach zwei Richtungen (der sauren oder alkalischen Seite hin) neutralisierend zu wirken, bei Säure- bzw. Alkalizusatz weit geringere Reaktionsverschiebungen als in Salzlösungen oder in reinem Wasser zuzulassen, sowie Widerstand gegen die Reaktionsverschiebung zu leisten. *Van Slyke* schrieb: „Eine Lösung mit zweimal so großen Pufferwerten wie eine zweite Lösung erfordert auch zweimal soviel Säure oder Base, um das p_H bei einer gegebenen kleinen Menge zu verändern."

Diese Eigenschaften des Gesamtpuffergemisches werden nicht nur die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration zur alkalischen oder sauren Seite vermindern oder verhindern, sondern auch die chemische Reaktion, und vor allem die Potentialveränderung, verlangsamen oder zum Stillstand bringen. Danach ist es sehr wahrscheinlich, daß die Gesamtpufferwirkung unter Umständen in einer Lösung direkt proportional zur Menge des vorhandenen Puffergemisches steht.

Von dieser theoretischen Grundlage kann man nun folgende Deduktionen über Pufferungswirkung auf Potentialveränderungen der Blutbestandteile bei Benutzung der Chinhydronelektrode ableiten:

1. In einer sauerstoffhaltigen, ganz pufferarmen Lösung wird die Wasserstoffionenverschiebung sehr schnell vor sich gehen und das Potential anfangs so schwanken, daß es überhaupt nicht gemessen werden kann.

2. Je reicher die zu messende Blutlösung an Puffergemisch ist, um so geringer wird die Potentialveränderung und um so günstiger für die Messung, und umgekehrt.

3. Enthalten die zu messenden Bestandteile erheblich große Mengen von Puffergemisch, so kann die Gesamtpufferung die ganze Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration möglicherweise vollständig zum Stillstand bringen, sodaß das Potential konstant bleibt.

4. Da die Pufferung in einem bestimmten Bereich des p_H die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration und die chemische Reaktion immer verhindern oder vermindern wird, so folgt, daß Zusatz von Puffergemisch den ganzen Potentialverlauf so verändert, daß schnelle Reaktionen verlangsamt und langsame in manchen Fällen vollständig verhindert werden können.

Da Serum oder Plasma pufferärmer ist als normales Blut, wird hier die Potentialveränderung noch größer sein. Bei der pufferreichen roten Blutkörperchensuspension und der Hämoglobinlösung dagegen werden sich viel konstantere Resultate ergeben.

Folgende Untersuchungen sollen dies näher darlegen.



Der Verlauf des Potentials bei Serum und Plasma.

E. Mislowitzer zeigte, daß das Potential mit großer Regelmäßigkeit in den ersten Minuten um 2 bis 2,5 Millivolt abfiel. Nach der dritten Minute wurde der Abtrieb langsamer, ungefähr 1 bis 1,5 Millivolt pro Minute usw. Er kommt zu dem Ergebnis, daß das Potential in den ersten 15 bis 30 Sekunden sich durch Extrapolation finden läßt.

Tabelle I.

Potentialverläufe (Platinelektrode).
Messung von 1 : 4 verdünntem menschlichen Plasma.

Zeit	Nr. 1		Nr. 2		Nr. 3	
	mit NaCl-Lösung	mit Phosphatlösung	mit NaCl-Lösung	mit Phosphatlösung	mit NaCl-Lösung	mit Phosphatlösung
1/6′	172,0	129,0	164,0	125,0	176,5	132,0
1/2	172,0	129,0	164,0	125,0	176,5	133,0
3/4	171,0	129,0	163,0	127,0	176,5	134,0
1	170,0	130,0	162,0	128,0	174,0	134,5
2	167,0	131,0	160,0	129,0	171,5	136,0
3	164,0	131,0	158,0	129,0	170,0	137,0
4	162,0	131,0	156,0	130,0	169,0	138,0
5	161,0	131,0	153,5	130,0	168,0	138,5
6	159,0	131,0	152,0	131,0	167,0	139,0
7	158,5	131,0	151,0	132,0	166,0	139,5
8	158,0	131,0	150,0	132,0	165,0	140,0
9	157,0	132,0	148,5	132,0	164,5	140,0
10	156,0	132,0	147,0	133,0	163,0	140,0
11	155,0	132,0	146,5	133,0	162,0	140,0
12	154,0	132,0	146,0	134,0	161,0	140,0
13	153,0	132,0	145,0	134,0	160,5	139,5
14	153,0	132,0	144,5	134,0	160,0	139,5
15	152,5	132,0	144,0	134,5	159,5	139,5

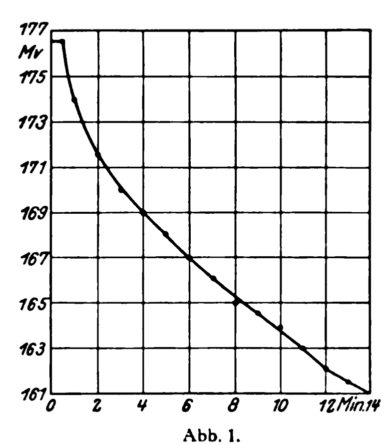


Abb. 1.
Potentialverlauf von 1 : 4 mit 0,85 % NaCl verdünntem Plasma. Nr. 3.

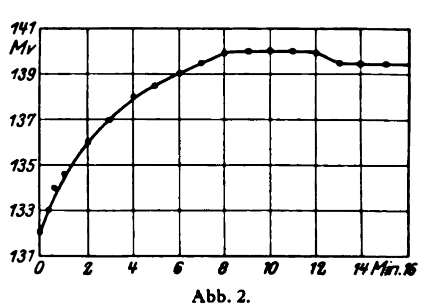


Abb. 2.
Potentialverlauf von 1 : 4 mit Phosphatgemisch verdünntem Plasma. Nr. 3.

Tabelle II.
Potentialverläufe (Platinelektrode).
Messung von 1 : 4 verdünntem menschlichen Serum.

Zeit	Nr. 4		Nr. 5	
	mit NaCl-Lösung	mit Phosphatlösung	mit NaCl-Lösung	mit Phosphatlösung
1/6′	169,5	127,0	164,0	126,0
1/2	169,5	127,0	164,0	126,0
3/4	168,0	127,0	163,0	126,0
1	167,0	127,0	162,0	126,5
2	163,0	127,0	159,0	126,5
3	160,0	127,0	157,5	126,5
4	158,0	127,0	156,0	126,5
5	156,5	127,0	154,0	127,0
6	154,5	127,5	152,5	127,0
7	153,5	127,5	151,3	127,5
8	152,0	127,5	150,0	127,5
9	151,0	127,5	149,0	127,5
10	150,0	127,5	148,0	127,5
11	149,0	127,5	147,0	127,5
12	148,5	127,5	146,0	127,5
13	147,8	127,5	145,5	127,5
14	147,0	127,5	145,0	127,0
15	146,0	127,5	144,5	127,0

Unser Resultat kommt dem seinen sehr nahe. Tabelle I, Nr. 1 und 2 zeigen bereits 1 Tag altes Serum, nicht unter Paraff. liquid. Tabelle II, Nr. 4 bis 5 sind Proben von meinem Blut unter Paraff. liquid. Serum oder Plasma derselben wurden teils in 1 : 4 physiologischer Kochsalzlösung, teils in 1 : 4-Phosphatgemisch (primäres 1 Teil und sekundäres 2 Teile) gemessen. Alle diese Messungen mit Kochsalzlösung zeigen ein konstantes Maximumpotential in der ersten halben Minute und dann einen sich immer mehr verlangsamenden Abfall. Die Abfallgeschwindigkeit ist verschieden, je nach dem Hämoglobininhalt. Beide, Serum und Plasma, zeigen keinen großen Unterschied. Es gelang uns nicht, den Potentialsprung fest-

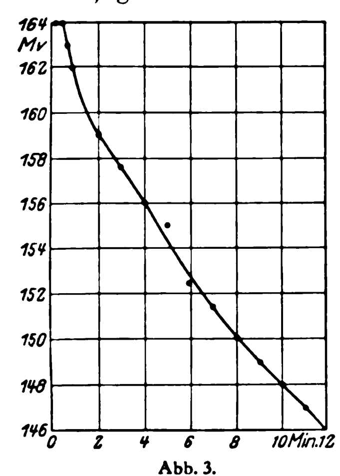


Abb. 3.
Potentialverlauf von 1 : 4 mit 0,85% NaCl verdünntem Serum. Nr. 5.

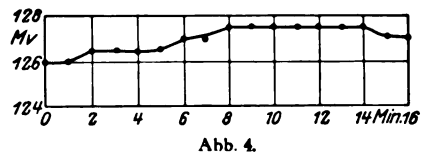


Abb. 4.
Potentialverlauf von 1 : 4 mit Phosphatgemisch verdünntem Serum. Nr. 5.

zustellen, das Maximumpotential jedoch läßt sich ganz genau ablesen.

Wenn das Serum oder Plasma nicht zu viel Hämoglobin enthält, kann man einen ziemlich regelmäßigen Verlauf erzielen. Das Maximumpotential ist hier in der ersten halben Minute sehr gut ablesbar. Da die Potential-Abfallgeschwindigkeit je nach der chemischen Zusammensetzung schnell und schwankend ist, kann man nicht mit Sicherheit extrapolieren.

Andererseits zeigen die Messungen mit dem Phosphatgemisch immer einen ganz langsamen Potentialanstieg und in einem Falle fast gar keine Veränderung. Diese Potentiale kommen bei 15 Minuten noch nicht zum Abfall. Um diese Potentiale in ihrem vollständigen Verlaufe zu zeigen, haben wir die Messung in Tabelle III bis 40 Minuten angeführt. Der Verlauf stellt sich als sehr langsam dar.

Tabelle III.

Potentialverlauf von menschlichem Serum mit 1 : 4 Phosphatgemisch m/15 (Platinelektrode).

Zeit	Nr. 6	Zeit	Nr. 7
1/6′	122,0	1/6′	126,0
1/2	122,0	1/2	126,0
3/4	122,0	3/4	126,0
1	122,0	1	126,5
2	123,0	2	126,5
4	123,0	3	127,0
5	123,5	4	127,0
6	124,0	5	127,5
11	124,0	13	127,5
12	124,5	14	127,0
21	124,5	18	127,0
22	124,0	19	126,5
23	123,5	25	126,5
24	123,0	30	126,5
40	123,0	40	126,5

Die chemische Veränderung des Serums in der Chinhydronelektrode.

G. E. Cullen und *Biilmann* behaupten, daß Serum, welches Spuren von Hämoglobin enthält, unbeständige Werte ergibt. *E. Mislowitzer* schrieb: „Ob das Plasma durch Hämolyse rötlich gefärbt ist oder durchaus rotfrei erscheint, ist für das Tempo des Potentialabfalles völlig belanglos. Daraus ist zu schließen, daß entweder das Hämoglobin nichts mit dem Potentialabfall zu tun hat, oder nicht sichtbare Spuren schon dieselbe Wirkung haben wie große, deutlich erkennbare Mengen.“

Da die ganzen Veränderungen hauptsächlich auf chemischer Grundlage erklärt werden können, so läßt sich folgendermaßen ausführen: Für den Potentialanstieg:

Da der Potentialabfall ungefähr drei- bis viermal schneller als bei 1:4 verdünntem normalen Blute vor sich geht, muß der Potentialanstieg so schnell stattfinden, daß er nicht meßbar ist. Der Potentialsprung ist auf jeden Fall vorhanden. Eine Messung mit Zusatz von Phosphatgemisch bringt den Potentialanstieg zur Darstellung. Dieses Puffergemisch hält den Potentialanstieg und -abfall bis zu solcher Langsamkeit zurück, daß man sie ganz genau messen kann. Dies zeigt auch, daß Serum genügend chemische Bestandteile enthält, um den Potentialanstieg einzuleiten, wenn ein gutes Puffergemisch vorhanden ist. Die Hauptursachen für den außerordentlich schnellen Potentialsprung sind folgende:

1. Da Serum viel pufferärmer als Vollblut ist, so kann es anscheinend den Potentialverlauf der Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge des Chinhydrons nicht so vollständig verhindern. Die Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge spielen hier vielleicht eine bedeutende Rolle.

2. Die chemische Reaktion zwischen Serum und Chinhydron ist wiederum eine sehr verwickelte. Es ist auch möglich, daß hier die katalytische Reaktion vorhanden ist, wodurch die chemische Reaktion sowie die Geschwindigkeit des Potentialanstiegs besonders vergrößert wird.

3. Die chemischen Reaktionen sowie die Reaktionsgeschwindigkeit finden schneller in einer pufferfreien als in einer pufferhaltigen Lösung statt. Unsere Ergebnisse in der vorigen Mitteilung haben gezeigt, daß Zusatz kleiner Mengen von m/15 Phosphatgemisch, 1 : 50-Verdünnung, den Potentialverlauf der Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge erheblich vermindern kann.

Nimmt man alle Faktoren zusammen, so kann man den außerordentlich schnellen Potentialanstieg größtenteils erklären.

Für den Potentialabfall kommen außer Oxydations-, Reduktions-, Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgängen usw. noch die folgenden Faktoren in Betracht:

1. Eiweißstörung. Nach *Kolthoff* verschiebt die Eiweißstörung die Reaktion nach der sauren Seite hin, und bei Blutserum mit einem p_H größer als 6,0 ist der Fehler sehr groß. Da Serum pufferärmer ist, tritt der Eiweißfehler noch größer auf, und das Resultat ist demnach noch weniger konstant.

2. Nach *Starling* enthält Serum 0,048 % Sauerstoff, gegen nur 0,034 % in Blutkörperchen. *Kolthoff* erklärt „die Sauerstoffstörung um so größer, je geringer die Pufferkapazität“. Also ist im Serum

reichlich genug Sauerstoff vorhanden, um die Oxydationsvorgänge verursachen zu können.

3. Anwesenheit von Hämoglobin. Spuren von Hämoglobin sind sehr häufig im Blute vorhanden. Das Hämoglobin liefert Sauerstoff und vor allem Puffergemisch. Die von *G. E. Cullen* und *Biilmann* aufgestellte Erklärung ist sehr unwahrscheinlich, bestimmt aber nicht annehmbar. Wir stimmen auch nicht mit *Mislowitzer* in seiner Auffassung überein, daß das Hämoglobin nichts mit dem Potentialabfall zu tun habe, oder daß nicht sichtbare Spuren schon dieselbe Wirkung wie große, deutlich erkennbare Mengen haben. Die ganze Sache ist nicht so unerklärlich, sondern ein komplizierter chemischer Vorgang, dessen Hauptreaktionen sich einzeln herauslösen und analysieren lassen. Das Puffergemisch vom Hämoglobin wird den Potentialabfall im Verhältnis der vorhandenen Mengen verhindern, kann ihn aber nicht verursachen. Große Hämoglobinmengen werden zweifellos den Potentialabfall sowohl, wie auch den Potentialanstieg völlig zum Stillstand bringen.

Der Potentialverlauf von Blutkörperchensuspensionen und Hämoglobinlösungen.

Tabelle IV. Die Blutkörperchensuspensionen mit Kochsalzlösung zeigen ganz langsame und allmähliche Verläufe; bei Phosphatlösung

Tabelle IV. Potentialverläufe von Blutkörperchensuspension des menschlichen Blutes (Platinelektrode).

Zeit	Mit physiologischer Kochsalzlösung		Mit Phosphatlösung	
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4
1/6′	165,0	169,0	138,0	138,0
1/2	165,3	169,0	139,0	139,0
3/4	165,3	170,0	140,0	140,0
1	165,3	170,0	142,0	142.0
2	164,0	168,5	144,0	143,0
3	163,0	168,0	145,0	144,0
4	161,0	167,0	146,0	145,0
5	160,0	166,0	147,0	145,5
6	160,0	165,0	148,0	146,0
7	160,0	165,0	149,0	146,5
8	160,0	165,0	150,0	147,0
9	160,0	164,5	151,0	147,5
10	160,0	164,5	151,5	147,5
11	160,0	164,0	151,5	147,5
13	160,0	164,0	152,0	147,5
15	160,0	164,0	152,5	148,0
16	160,0	164,0	153,0	148,0
19			153,0	148.5
21				149.5
24				150,0
28				150,5
60				150,5

jedoch ergeben sich noch langsamere Verläufe, die am Ende der ersten Stunde noch nicht abzufallen beginnen.

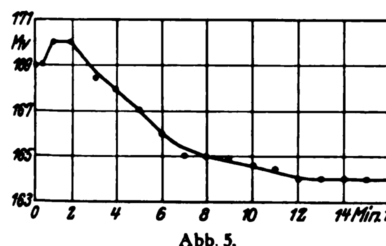


Abb. 5.
Potentialverlauf von Blutkörperchensuspension in 0,85 % NaCl-Lösung. Nr. 2.

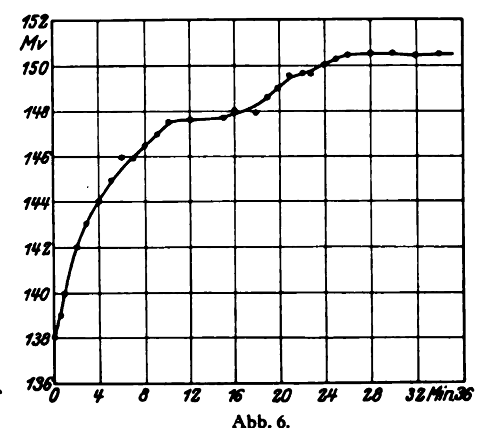


Abb. 6.
Potentialverlauf von Blutkörperchensuspension in Phosphatgemisch. Nr. 4.

Tabelle V. Die Hämoglobinlösungen in Phosphatgemisch zeigen binnen 20 Minuten keine Veränderung im Potential.

Tabelle V. Messungen (Platinelektrode).

	Temperatur °C	Minuten	Millivolt
Hämoglobinlösung in physiologischer Kochsalzlösung .	20	0—20	173 (ohne Abtrieb)
Hämoglobinlösung in Phosphatgemisch	19	0—20	150 (ohne Abtrieb)
Serum mit Phosphatgemisch .	22	0—15	127 (ohne Abtrieb)
Phosphatgemisch	20	0—20	151 (ohne Abtrieb)
Harn	22	0—20	103 (ohne Abtrieb)

Die chemische Veränderung der Hämoglobinlösung in der Chinhydronelektrode.

Hier spielt die Pufferung die Hauptrolle. Setzt man dem Serum Blutzellen zu, so bekommt man immer eine flach verlaufende p_H-Kurve des Blutes. Die Reaktion verschiebt sich nach der alkalischen Seite hin. *Hasselbalch* betont: „Eine hochkonzentrierte Hämoglobinlösung, wie sie der Blutkörperchenbrei darstellt, ist für Pufferung noch wirksamer“. *Kolthoff* berichtet auch: „Hat die Lösung eine gute Pufferwirkung, so erhält man bei 18° C bis p_H von 9,2 gute Werte“. Durch den ampholyten Charakter des Puffergemisches wird die chemische Reaktion, wie Oxydation, Reduktion usw., sowie auch eine Veränderung von Potential und Wasserstoffionenkonzentration verhindert. Das Puffergemisch besteht aus Phosphat, Bicarbonat, Protein und Hämoglobin.

Van Slyke, *Hsien-Wu* und *F. C. McLean* vertreten die Ansicht, daß die „Gesamtpufferung“ eine lineare Funktion von Hämoglobin und

Serumprotein ist. Daraus kann man schließen, daß die Konstanz des Potentials bei Hämoglobinlösungen hauptsächlich durch die Pufferung bewirkt wird. Das zugesetzte Phosphatgemisch verlangsamt und verhindert nicht nur die Potentialveränderung, sondern auch die chemische Reaktion. Die Potentialkurven von Plasma, Serum und unter gewissen Bedingungen auch Blutkörperchensuspension in physiologischer Kochsalzlösung beugen sich immer nach unten, während die Kurven mit Phosphatgemisch sich nach oben biegen. Der Potentialanstieg wird erheblich verlangsamt, und der Abfall ist ganz gering, bei Blutkörperchensuspensionen sogar ganz ohne Abtrieb.

Daraus kann man weiter schließen, daß ein Puffergemisch die folgenden Wirkungen hat:

a) Die schnelle Potentialveränderung wird verlangsamt oder die langsame verhindert. Da der Potentialanstieg immer schneller als der Abfall ist, findet man, daß der Anstieg verlangsamt wird und der Abfall überhaupt nicht auftritt.

b) Es ist sehr wohl möglich, daß das Gesamtpuffergemisch hier auch als negativer Katalysator wirkt, der die chemische Reaktion, wie Oxydation und Reduktion, vermindert. Diese Wirkung hängt wahrscheinlich von der Menge des Puffergemisches ab.

Die regulatorische und antikatalytische Wirkung des Puffergemisches kann als Hauptursache für die Verlangsamung oder Verhinderung der Potentialveränderungen angenommen werden.

Wir haben Augenkammerwasser von Hunden gemessen. Die Proben waren ganz klar, frei von Hämoglobin. Die Benzidinprobe war negativ. Die Potentialschwankungen sind so groß, daß man sie nicht genau ablesen kann. Die p_H von drei Proben sind ungefähr, aber nicht bestimmt, 7,58, 7,73 und 7,46. Durch Zusatz von Phosphat wird die Potentialveränderung verhindert. Diese Potentialveränderung ist entschieden hauptsächlich auf die Anwesenheit von Sauerstoff zurückzuführen. Nach *Starling* enthält Augenkammerwasser Globulin, Albumin, reduzierenden Zucker und ist vielleicht reichlich mit Sauerstoff gemischt. Diese Untersuchungen bestätigen weiter unsere Auffassung über die Potentialveränderung bei Serum.

Es läßt sich daraus schließen, daß alle pufferarmen, sauerstoffhaltigen Gewebsflüssigkeiten im Körper bedeutendere Potentialveränderungen ergeben.

Die Beziehung der Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge des Chinhydrons zu den verschiedenen Potentialverläufen von Serum, Plasma, Hämoglobinlösung und Gewebsflüssigkeiten.

Die Auflösungs- bzw. Sättigungsverläufe bilden die Basis für alle Potentialveränderungen.

Tabelle VI. Das Phosphatgemisch (primäres 1 Teil und sekundäres 16 Teile) hat einen p_H von 7,39. Das 1 : 4 verdünnte Phosphatgemisch mit physiologischer Kochsalzlösung zeigt ganz geringe Potentialveränderung, während das 1 : 4 verdünnte Serum einen schon merkbaren Verlauf ergibt. Die 1 : 10 und 1 : 20 verdünnten Serumproben zeigen großen Potentialabfall. Durch weitere Verdünnung des Serums wird das Potential immer schwankender und niedriger. Dieser große Unterschied zwischen Phosphatgemisch und Serum zeigt, daß Serum Sauerstoff, Eiweißstoffe und anderes enthält, die das leicht veränderliche Chinhydron beeinflussen. Der Potentialverlauf von Plasma und Serum wird hauptsächlich durch die angegebenen Faktoren hervorgerufen.

Tabelle VI.

Potentialverläufe von verdünntem Phosphatgemisch und Serum.

	Phosphatgemisch*)		Serum					
Verdünnung: Durchrühren: Zeit	1 : 4 15 Sek. Millivolt	1 : 20 15 Sek. Millivolt	1 : 4 15 Sek. Millivolt	1 : 10 15 Sek. Millivolt	1 : 20 15 Sek. Millivolt	1 : 20 15 Sek. Millivolt	1 : 500 15 Sek. Millivolt	1 : 500 15 Sek. Millivolt
1/4'	156	141,8	169,5	169				
1/2	156	140,5	169,5	165	154	154,0		
1	156	139,0	167,0	162	154	150,0	46,0	40
2	156	137,0	163,0	157	150	149,0	43,5	28
3	156	137,0	160,0	156	145	148,5	39,0	24
4	155	137,0	158,0	154	137	148,0	35,0	19
5	155	136,0	156,5	153	135	146,0	32,0	16
6	155	136,0	154,5	152	132	140,0	30,0	15
7	155	136,0	153,5	151	131	138,0	29,0	14
8	155	136,0	152,0	150	130	137,0	28,5	14
9	155	135,0	151,0	149	129	136,0	28,0	14
10	155	135,0	150,0	148	128	135,0	27,0	14

*) Das Phosphatgemisch hat ein p_H von 7,62.

Bei den ganz pufferarmen, sauerstoffhaltigen Gewebsflüssigkeiten wird der Potentialverlauf besonders schwankend, denn hier sind die Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgänge des Chinhydrons, Oxydation, Reduktion usw., sehr groß. Die pufferreiche Hämoglobinlösung kann die Auflösungs- bzw. Sättigungsverläufe, wie auch die anderen chemischen Veränderungen ganz verhindern.

Nach unserem Ergebnis der gesamten Arbeit über die verschiedenen Potentialverläufe von Auflösungs- bzw. Sättigungsvorgängen des Chinhydrons, von verdünntem Blut, Plasma und Serum, sowie von Hämoglobinlösung kann man nicht nur die Hauptreaktionen und -fehler genau nachweisen, sondern auch die Potentialveränderungen und -schwankungen je nach der Natur und Konzentration der chemischen Bestandteile der zu messenden Lösung ungefähr vorhersagen. Von reinem Serum bis zur Hämoglobinlösung ergibt sich eine Reihe all-

mählich immer flacher werdender, dann sich nach oben wölbender Verlaufskurven bis zur geraden Linie.

Es möge hier noch erwähnt sein, daß sich auch in der Praxis einige Nachteile herausstellen, deren einer der ist, daß sich durch mechanisches Durchrühren das Vollblut erheblich verändern kann. Ferner fördert und beschleunigt zwar die Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung die geeignete Vermischung der Blutbestandteile, vergrößert aber andererseits die Potentialveränderungen und wirkt, wenn zu weit durchgeführt, erniedrigend auf das Potential.

Zusammenfassung.

1. Plasma und Serum in 1 : 4-Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung zeigen einen ziemlich regelmäßigen Potentialverlauf bei Benutzung der Chinhydronelektrode, d. h. einen außerordentlich schnellen Potentialanstieg, ein konstantes Maximumpotential für ½ Minute und schließlich einen allmählich immer langsamer werdenden Potentialabfall.

2. Pufferreiche Hämoglobinlösung, wie auch Blutkörperchensuspension ergeben ganz geringe Potentialveränderung.

3. Die Potentialveränderung wird durch die Reaktionen für die Verschiebung der [H'] vergrößert und durch die Reaktionen gegen die Verschiebung der [H'] verkleinert.

4. Die theoretischen Deduktionen über die Pufferwirkung auf die verschiedenen Potentialverläufe stimmen mit experimentellen Daten überein.

5. Für die pufferarmen sauerstoffhaltigen Gewebsflüssigkeiten ist die Chinhydronelektrode nicht gut anwendbar.

Zum Schlusse sage ich Herrn Privatdozent Dr. *Ernst Herzfeld* für Anregung und Unterstützung der vorliegenden Untersuchungen, sowie Herrn Dr. *R. Krüger* wiederum für die freundliche Hilfe ergebensten Dank.

Literatur.

Schau-Kuang Liu, diese Zeitschr. **185**, 242, 255, 1927. — *M. Koppel* und *K. Spiro*, ebendaselbst **65**, 409, 1914. — *D. D. van Slyke*, Journ. of Biol. Chem. **52**, 525, 1922. — *E. H. Starling*, Principles of Human Physiology, 1920; Handb. d. Biochemie der Menschen und Tiere, herausgegeben von *C. Oppenheimer*, **4**, 2. Auflage. — *W. Nernst*, Theoretische Chemie 1926.



Beiträge zur Kenntnis der Milchsäure.

IV. Mitteilung[1]):

Die Verteilung der Milchsäure zwischen Wasser und Äther sowie Wasser und Amylalkohol.

Von

R. Dietzel und **E. Rosenbaum.**

(Mitteilung aus der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in München.)

(Eingegangen am 4. April 1927.)

Die quantitative Bestimmung der Milchsäure in tierischen und pflanzlichen Stoffen bereitet insofern Schwierigkeiten, als diese Säure hierbei von störenden Säuren abgetrennt werden muß. Ein Verfahren, das vielfach, z. B. bei der Bestimmung der Milchsäure im Wein angewendet wird, beruht darauf, daß man die Milchsäure zusammen mit den anderen vorhandenen Säuren (Weinsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure usw.) durch Äther in geeigneten Apparaten vollständig extrahiert, die Essigsäure durch Wasserdampfdestillation aus dem ätherischen Auszug entfernt und das Bariumlactat mittels 60- bis 70%igen Alkohols von den übrigen Bariumsalzen abtrennt. Umständlich und zeitraubend ist hierbei, daß zur vollständigen Erschöpfung der Milchsäure ein 24- bis 48stündiges Extrahieren in geeigneten rotierenden Apparaten nötig ist.

Ein von *E. Ohlson*[2]) angegebenes Verfahren, bei dem als Extraktionsflüssigkeit an Stelle von Äther Amylalkohol angewendet wird, bedeutet einen wesentlichen Fortschritt, da der Verteilungskoeffizient zwischen Milchsäure und Amylalkohol weit günstiger ist als derjenige zwischen

---

[1]) Vgl. hierzu *R. Dietzel* und *R. Krug*, Über das chemische Gleichgewicht zwischen der Milchsäure und ihren Anhydriden in wässeriger Lösung, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **58**, 1307, 1925; Optische Untersuchungen über die Milchsäure und ihre Anhydride, Arch. d. Pharm. **264**, 117, 1926; *R. Dietzel* und *E. Rosenbaum*, Die elektrolytische Dissoziation der Milchsäure, Zeitschr. f. Elektrochem. **33**, 1927.

[2]) *E. Ohlson*, Phys. Inst. Lund, Skand. Arch. f. Physiol. **33**, 231, 1916.

Milchsäure und Äther. Die langwierigen Arbeiten, die zur vollständigen Extraktion der Milchsäure notwendig sind, können nun vermieden werden, wenn auf diese verzichtet und dafür die zu untersuchende Lösung nur bis zur Einstellung des Gleichgewichts mit dem zur Extraktion dienenden Lösungsmittel geschüttelt wird. Nach *Nernst* läßt sich dann, wenn man den Verteilungskoeffizienten zwischen Milchsäure und dieser Flüssigkeit unter den vorliegenden Bedingungen kennt, der Milchsäuregehalt der untersuchten Lösung aus der in der Verteilungsflüssigkeit gefundenen Menge berechnen.

Nach dem *Nernst*schen Verteilungssatz verteilt sich ein gelöster Stoff zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten im Gleichgewicht derart, daß seine Konzentrationen in beiden Lösungsmitteln — gleiche Temperatur vorausgesetzt — in einem konstanten Verhältnis stehen, unabhängig von der Menge der Lösungsmittel. Dies gilt jedoch nur für den Fall, daß der gelöste Stoff in beiden Lösungsmitteln gleiche Molekelarten bildet. Ist z. B., wie bei der Verteilung der Pikrinsäure zwischen Wasser und Äther[1]), die Säure in wässeriger Lösung *elektrolytisch dissoziiert*, so darf nur der nicht dissoziierte Anteil der Säure in der wässerigen Phase berücksichtigt werden. Kennt man ihre Dissoziationskonstante, so läßt sich der Dissoziationsgrad rechnerisch ermitteln. Man kann aber auch durch Zusatz einer stärkeren, in Äther sehr schwer löslichen Säure die Dissoziation der zu untersuchenden Säure in Wasser so weit zurückdrängen, daß der dissoziierte Anteil praktisch nicht mehr in Betracht kommt. Gleichzeitig erreicht man dadurch einen günstigeren, d. h. größeren Verteilungskoeffizienten.

Tritt *Assoziation* in einer Phase auf, wie z. B. *W. Nernst*[2]) und später *W. S. Hendrixson*[3]) bei der Verteilung von Benzoesäure zwischen Wasser und Benzol feststellten, so kann Konstanz des Verhältnisses der Gesamtkonzentration des Stoffes in beiden Phasen nur erwartet werden, wenn einerseits die Dissoziation in Wasser, andererseits die Polymerisation in der anderen Phase berücksichtigt wird. Ähnlich wie *W. Nernst* und *W. S. Hendrixson* fanden *Fr. Auerbach* und *H. Zeglin*[4]) bei Verteilungsversuchen der Ameisensäure zwischen Wasser und Äther, daß trotz rechnerischer Berücksichtigung der elektrolytischen Dissoziation der Ameisensäure in Wasser der Verteilungskoeffizient nicht konstant war, sondern linear abhängig von der Konzentration der Ameisensäure in der wässerigen Phase. Der Gang des Verteilungskoeffizienten konnte durch Polymerisation (Doppelmolekelbildung) der Ameisensäure in Äther erklärt werden.

---

[1]) *V. Rothmund* und *C. Drucker*, Zeitschr. f. phys. Chem. **46**, 851, 1903.
[2]) *W. Nernst*, Zeitschr. f. phys. Chem. **8**, 110, 1891.
[3]) *W. S. Hendrixson*, Zeitschr. f. anorgan. Chem. **13**, 7, 1897.
[4]) *Fr. Auerbach* und *H. Zeglin*, Zeitschr. f. phys. Chem. **103**, 200, 1922. vgl. auch *Fr. Auerbach* und *K. Beck*, Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt **57**, 24, 1926 (Festband).



Die bisher von *J. Pinnow*[1]), *E. Ohlson*[2]), *G. Riesenfeld*[3]), *R. Ege*[4]) und *W. U. Behrens*[5]) ausgeführten Untersuchungen zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten der Milchsäure zwischen Wasser und Äther enthalten nur wenig Zahlenmaterial. Die Verteilungskoeffizienten sind nicht mit der genügenden Genauigkeit ermittelt worden, um für exakte analytische Bestimmungen in Betracht zu kommen. So hat z. B. *J. Pinnow*, der bei 15° einen Gang des Verteilungskoeffizienten der Milchsäure von 12,27 bis 9,19 beobachtete, wegen Nichtberücksichtigung der elektrolytischen Dissoziation nicht den wahren, sondern nur den auf die Gesamtmenge der Milchsäure bezogenen Verteilungskoeffizienten ermittelt, der mit der Konzentration variiert. Auch in den übrigen vorgenannten Untersuchungen blieb die elektrolytische Dissoziation der Milchsäure unberücksichtigt.

Die folgenden Verteilungsversuche wurden einerseits mit anhydridfreier Milchsäure[6]), andererseits mit anhydridhaltiger Handelsmilchsäure (Milchsäure chemisch rein *C. H. Boehringer Sohn*, Pharmakopoe G. 5 90/91 Gewichtsprozent, spezifisches Gewicht 1,21; Milchsäure *Byk-Guldenwerke* D. A. B. V) ausgeführt.

Der für die Verteilungsversuche benutzte Äther hatte einen Siedepunkt von 34,5° (760 mm) und eine Dichte $d^{20^0}_{4^0} = 0{,}713$. Er wurde zur Entfernung von etwaigen Alkoholresten nach 24stündigem Stehen über Natriumdraht von diesem abdestilliert und wiederholt mit Leitfähigkeitswasser geschüttelt. Die wässerigen Auszüge wurden außerdem mit der Jodoformprobe auf Alkohol geprüft, und erst nach Ausbleiben dieser Reaktion wurde der Äther benutzt. Dieser kam also stets in mit Wasser gesättigtem Zustande zur Anwendung.

Der verwendete Amylalkohol hatte einen Siedepunkt von 131,0° (760 mm) und eine Dichte $d^{20^0}_{4^0} = 0{,}810$. Mit konzentrierter Schwefelsäure geschüttelt, trat nur eine schwach gelbliche Färbung auf (Furfurol und andere organische Verunreinigungen), mit konzentrierter Kalilauge verfärbte er sich nicht.

1. Versuchsanordnung.

Bestimmte Mengen von Milchsäure wurden in etwa 125 ccm fassenden Erlenmeyerkölbchen mit je 50 ccm Leitfähigkeitswasser und Äther bzw. Amylalkohol versetzt. Die Kolben wurden mit Gummistopfen verschlossen und, um die Verschlüsse der vollständig unter Wasser befindlichen Kölbchen vor Benetzung zu schützen, die bei dem

[1]) *J. Pinnow*, Zeitschr. f. anal. Chem. **54**, 330, 1915.
[2]) *E. Ohlson*, l. c.
[3]) *G. Riesenfeld*, diese Zeitschr. **109**, 249, 1920.
[4]) *R. Ege*, ebendaselbst **134**, 476, 1923.
[5]) *W. U. Behrens*, Zeitschr. f. anal. Chem. **69**, 97, 1926.
[6]) Über die Darstellung der anhydridfreien Milchsäure vgl. *R. Dietzel* und *E. Rosenbaum*, Zeitschr. f. Elektrochem. **33**, 1927.

späteren Abpipettieren hätte zu Fehlern führen können, mit luftdicht schließenden Gummikappen umgeben. Die Kölbchen wurden dann im Thermostaten bis zur Einstellung des Gleichgewichts geschüttelt. Die Temperatur des Thermostaten wurde durch einen mit Chlorcalciumlösung gefüllten elektrischen Thermoregulator auf $20 \pm 0{,}05^0$ gehalten. Zur Ermittlung der jeweiligen Konzentration der Milchsäure wurden aus beiden Phasen mit Pipetten, deren Volumen durch Auswägen mit Wasser festgestellt war, bestimmte Proben entnommen. Bei den Verteilungsversuchen mit Äther wurde, um Verdunstungsfehler auszuschalten, schnell gearbeitet. Die entnommenen Proben wurden dann nach sorgfältigem Ausspülen der Pipetten mit Leitfähigkeitswasser auf ein bestimmtes Volumen verdünnt und der Gehalt an Milchsäure mit Phenolphthalein als Indikator bestimmt. Der durch die Kohlensäure der Luft bzw. durch Atmung entstehende Titrationsfehler wurde dadurch vermieden, daß im geschlossenen Gefäß titriert wurde.

2. Verteilung von anhydridfreier Milchsäure zwischen Wasser und Äther

Bei der Ermittlung des Verteilungskoeffizienten von anhydridfreier Milchsäure zwischen Wasser und Äther wurde zunächst die Dissoziation der Säure in der wässerigen Phase rechnerisch berücksichtigt. Eine Dissoziation der Milchsäure in der ätherischen Schicht kommt praktisch nicht in Betracht. Auch kann man die durch die Auflösung von kleinen Mengen Äther in Wasser etwa bedingte Änderung des Dissoziationsgrades der Milchsäure außer acht lassen. Die Berechnung des Dissoziationsgrades von wässerigen Milchsäurelösungen bestimmter Konzentration aus der Dissoziationskonstante ist unbequem. Deshalb wurde ein Interpolationsverfahren[1]) angewendet, welches gestattet, für beliebige Milchsäurekonzentrationen c den zugehörigen Dissoziationsgrad α zu bestimmen. Trägt man in einem Koordinatensystem $\log \alpha$ gegen $\log c$ auf, so entsteht eine gerade Linie, die durch die Gleichung ausgedrückt wird:

$$\log c + 2{,}1418 \,.\, \log (\alpha \,.\, 10^2) = 0{,}198.$$

Wie wir früher gezeigt haben, stimmen die nach dieser Interpolationsgleichung berechneten Werte für die Dissoziationsgrade α der Milchsäure befriedigend mit den aus Leitfähigkeitsmessungen gefundenen Zahlen für α überein. Die obige Gleichung oder das entsprechende graphische Bild sind geeignet, in dem Konzentrationsbereich der folgenden Messungen, unbedenklich auch für etwas konzentriertere Lösungen, den Dissoziationsgrad für beliebige Milchsäurekonzentrationen zu berechnen. Tabelle I enthält die für verschiedene

[1]) *R. Dietzel* und *E. Rosenbaum*, Zeitschr. f. Elektrochem. **33**, 1927.

Tabelle I.

Der Dissoziationsgrad α von anhydridfreier Milchsäure in wässeriger Lösung, berechnet nach der Interpolationsformel:

$$\log c + 2,1418 \log (\alpha \cdot 10^2) = 0,198.$$

1	2	3	1	2	3
Verdünnung v Liter/Mol	Konzentration c Mol/Liter	Dissoziationsgrad $\alpha \cdot 10^2$	Verdünnung v Liter/Mol	Konzentration c Mol/Liter	Dissoziationsgrad $\alpha \cdot 10^2$
1,00	1,000	1,236	5,59	0,180	2,748
1,05	0,950	1,265	6,25	0,160	2,897
1,11	0,900	1,291	7,14	0,140	3,091
1,18	0,850	1,334	8,33	0,120	3,319
1,25	0,800	1,377	10,0	0,100	3,614
1,33	0,750	1,420	11,1	0,090	3,790
1,43	0,700	1,460	12,5	0,080	4,010
1,54	0,650	1,510	14,3	0,070	4,270
1,67	0,600	1,567	16,7	0,060	4,580
1,86	0,550	1,633	20,0	0,050	4,990
2,00	0,500	1,706	25,0	0,040	5,530
2,22	0,450	1,790	28,6	0,035	5,880
2,50	0,400	1,892	32,3	0,030	6,340
2,86	0,350	2,023	40,0	0,025	6,487
3,33	0,300	2,173	50,0	0,020	7,630
4,00	0,250	2,355	66,7	0,015	8,730
4,43	0,225	2,477	100,0	0,010	10,54
5,00	0,200	2,613	1000	0,001	30,25

Konzentrationen von wässerigen Milchsäurelösungen zwischen n/1 und n/1000 ($v = 1$ und $v = 1000$) nach obiger Interpolationsgleichung berechneten Dissoziationsgrade α.

In Tabelle II sind die Ergebnisse der in vorstehender Weise beschriebenen Verteilungsversuche zusammengestellt und die aus den Konzentrationen der Milchsäure in der wässerigen und ätherischen Schicht berechneten Verteilungskoeffizienten $\frac{c_a}{c_w}$ bzw. $\frac{c_w}{c_a}$ eingetragen. Die bei sehr kleinen Konzentrationen infolge des unvermeidlichen Kohlensäurefehlers enthaltenen Verteilungskoeffizienten sind unsicher und deshalb mit Klammern versehen.

Man erkennt, daß die Verteilungskoeffizienten $\frac{c_a}{c_w}$ bzw. $\frac{c_w}{c_a}$ auch nach rechnerischer Berücksichtigung der elektrolytischen Dissoziation einen regelmäßigen Gang mit der Konzentration aufweisen. Die Werte für $\frac{c_w}{c_a}$ fallen von 11,3 auf 8,7.

Tabelle II.
Verteilungskoeffizient von anhydridfreier Milchsäure zwischen Wasser und Äther bei 20 ± 0,05°.

1	2	3	4	5	6
Gesamtkonzentration der Milchsäure		Dissoziationsgrad $\alpha . 10^2$	Konzentration der und assoziierten Milchsäure in wässeriger Schicht c_w Mol/Liter	Verteilungskoeffizient	
in ätherischer Schicht c_a Mol/Liter	in wässeriger Schicht c'_w Mol/Liter			$\frac{c_w}{c_a}$	$\frac{c_a}{c_w} = f$
0,0814	0,9310	1,28	0,9182	11,3	0,0887
0,0752	0,8600	1,33	0,8467	11,3	0,0881
0,0707	0,8020	1,38	0,7882	11,2	0,0897
0,0659	0,7500	1,42	0,7358	11,2	0,0895
0,0597	0,6770	1,48	0,6622	11,1	0,0902
0,0553	0,6220	1,54	0,6066	11,0	0,0913
0,0504	0,5660	1,61	0,5499	10,9	0,0917
0,0446	0,4910	1,72	0,4738	10,6	0,0941
0,0354	0,3850	1,93	0,3657	10,4	0,0965
0,0295	0,3110	2,05	0,2905	9,85	0,102
0,0249	0,2550	2,19	0,2331	9,36	0,107
0,0201	0,2010	2,61	0,1749	8,70	0,115
(0,0173)	(0,1630)	(2,87)	(0,1343)	(7,76)	(0,129)
(0,0158)	(0,1470)	(3,02)	(0,1168)	(7,39)	(0,135)
(0,0144)	(0,1270)	(3,24)	(0,0946)	(6,56)	(0,152)

3. Verteilung von anhydridfreier Milchsäure zwischen 0,5 n Schwefelsäure und Äther.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die elektrolytische Dissoziation der Milchsäure in der wässerigen Phase nicht rechnerisch berücksichtigt, sondern durch Schwefelsäure zurückgedrängt. Wie eine Überschlagsrechnung zeigt, genügt zur praktisch vollständigen Zurückdrängung der Dissoziation eine Konzentration von 0,5 n Schwefelsäure. Aus Tabelle III, die die einzelnen Versuchsergebnisse enthält, ist ersichtlich, daß die Verteilungskoeffizienten ebenfalls einen, wenn auch geringeren Gang mit der Konzentration aufweisen. Die etwas höheren Werte für die Verteilungskoeffizienten $\frac{c_a}{c_w}$ scheinen darauf zu beruhen, daß der Partialdruck der Milchsäure in der wässerigen Schicht etwas erhöht und die Löslichkeit des Wassers in Äther etwas verringert wird. Dieser Fehler fällt bei höheren Konzentrationen weniger ins Gewicht als bei niedrigeren.

Tabelle III.

Verteilungskoeffizient der anhydridfreien Milchsäure zwischen Äther und 0,5 n Schwefelsäure bei 20 ± 0,05°.

1	2	3	4
Gesamtkonzentration der Milchsäure		Verteilungskoeffizient	
in ätherischer Schicht c_a Mol/Liter	in 0,5 n Schwefelsäure c_w Mol/Liter	$\frac{c_w}{c_a}$	$\frac{c_a}{c_w} = f$
0,0835	0,9250	11,1	0,0903
0,0758	0,8380	11,1	0,0905
0,0680	0,7550	11,1	0,0901
0,0600	0,6680	11,1	0,0899
0,0521	0,5810	11,2	0,0897
0,0440	0,4900	11,2	0,0898
0,0360	0,4040	11,2	0,0891
0,0278	0,3170	11,4	0,0877
0,0199	0,2300	11,6	0,0865
0,0137	0,1580	11,5	0,0867
0,0108	0,1260	11,7	0,0857
0,0088	0,1029	11,7	0,0855
0,0075	0,0881	11,8	0,0851
0,0058	0,0684	11,8	0,0848

4. Einfluß der Temperatur auf den Verteilungskoeffizienten.

Um den Einfluß der Temperatur auf das Verteilungsverhältnis kennenzulernen, wurden Verteilungsversuche zwischen anhydridfreier Milchsäure und Äther bei verschiedenen Temperaturen zwischen 0 und 25° angestellt. Die Versuchsergebnisse finden sich in Tabelle IV. Es geht daraus hervor, daß die Werte $\frac{c_w}{c_a}$ fast konstant sind. Der Verteilungs-

Tabelle IV.

Verteilungskoeffizient von anhydridfreier Milchsäure zwischen Wasser und Äther bei verschiedenen Temperaturen.

1	2	3	4	5	6	7
Temperatur	Gesamtkonzentration der Milchsäure		Dissoziationsgrad $\alpha \cdot 10^2$	Konzentration der undissoziierten Milchsäure in wässeriger Schicht c_w Mol/Liter	Verteilungskoeffizient	
°C	in ätherischer Schicht c_a Mol/Liter	in wässeriger Schicht c'_w Mol/Liter			$\frac{c_w}{c_a}$	$\frac{c_a}{c_w} = f$
0	0,0322	0,3350	2,07	0,3143	9,76	0,102
5	0,0322	0,3396	2,05	0,3191	9,91	0,101
10	0,0321	0,3440	2,04	0,3236	10,1	0,0992
15	0,0321	0,3481	2,03	0,3279	10,2	0,0979
20	0,0320	0,3532	2,02	0,3330	10,4	0,0961
25	0,0320	0,3575	2,00	0,3375	10,6	0,0948

koeffizient ändert sich demnach mit der Temperatur innerhalb des betrachteten Temperaturbereichs nur sehr wenig. Es muß hierbei die gegenseitige Löslichkeit von Wasser und Äther bei den entsprechenden Temperaturen berücksichtigt werden. *E. A. Klobbie*[1]) gibt für die Löslichkeit von Wasser in Äther bzw. von Äther in Wasser folgende Werte an:

Temperatur °C	Äther in 100 g Flüssigkeit (wässerige Schicht) g	Äther in 100 g Flüssigkeit (ätherische Schicht) g
0	12,17	99,07
10	9,02	98,91
20	6,48	98,78
30	5,04	98,65

Diese Zahlen bedeuten die in 100 Gewichtsteilen der gesättigten Lösung enthaltene Anzahl Gewichtsteile des gelösten Stoffes. Bei 0° sind in 100 Gewichtsteilen gesättigter Lösung 12,17, bei 30° 5,04 Gewichtsteile Äther gelöst. Wie die Verteilungsversuche (Tabelle II) zeigen, nimmt Äther im Gemisch mit einer wässerigen Milchsäurelösung rund $^1/_{10}$ der Milchsäure auf. Beim Abpipettieren von je 10 ccm der wässerigen Lösung enthält die wässerige Schicht bei 0° rund doppelt so viel Äther wie bei 25°. Daraus läßt sich der in der Tabelle IV auftretende Gang des Verteilungskoeffizienten $\frac{c_w}{c_a}$ bei den verschiedenen Temperaturen von 9,76 bis 10,6 erklären. Absolut ist der Verteilungskoeffizient der Milchsäure bei gleicher Konzentration konstant, relativ ändert er sich deshalb, weil die gegenseitige Löslichkeit von Wasser und Äther mit der Temperatur variiert.

5. Verteilung von anhydridfreier Milchsäure zwischen Wasser und Amylalkohol.

Wie schon früher erwähnt, wurde wegen des günstigeren Verteilungskoeffizienten neben Äther auch Amylalkohol als Verteilungsflüssigkeit benutzt. Die gegenseitige Löslichkeit zwischen Wasser und Amylalkohol beträgt bei 22° 2,61 bzw. 97,35, wobei unter Löslichkeit wieder die in 100 Gewichtsteilen der gesättigten Lösung enthaltene Anzahl Gewichtsteile des gelösten Stoffes zu verstehen ist.

Die Ergebnisse der Verteilungsversuche zwischen Wasser und Amylalkohol sind in Tabelle V zusammengestellt. Die Dissoziation

[1]) *E. A. Klobbie*, Gleichgewichte in den Systemen Äther—Wasser und Äther—Wasser—Malonsäure. Zeitschr. f. phys. Chem. **24**, 615, 1897.

Tabelle V.

Verteilungskoeffizient von anhydridfreier Milchsäure zwischen Wasser und Amylalkohol bei 20 ± 0,05°.

1	2	3	4	5	6
Gesamtkonzentration der Milchsäure		Dissoziationsgrad $\alpha . 10^2$	Konzentration der undissoziierten Milchsäure in wässeriger Schicht c_w Mol/Liter	Verteilungskoeffizient	
in amylalkoholischer Schicht c_a Mol/Liter	in wässeriger Schicht c'_w Mol/Liter			$\frac{c_w}{c_a}$	$\frac{c_a}{c_w} = f$
0,3070	0,7560	1,42	0,7418	2,42	0,413
0,2425	0,7200	1,44	0,7056	2,41	0,415
0,2775	0,6800	1,48	0,6652	2,40	0,417
0,2625	0,6430	1,52	0,6278	2,39	0,418
0,2480	0,6070	1,56	0,5914	2,39	0,419
0,2320	0,5700	1,61	0,5539	2,39	0,419
0,2210	0,5370	1,66	0,5204	2,36	0,425
0,2060	0,5000	1,71	0,4829	2,34	0,427
0,1910	0,4630	1,78	0,4452	2,33	0,429
0,1760	0,4250	1,84	0,4066	2,31	0,433
0,1610	0,3880	1,92	0,3688	2,29	0,437
0,1470	0,3530	2,01	0,3329	2,27	0,440
0,1330	0,3190	2,11	0,2974	2,24	0,446
0,1170	0,2790	2,24	0,2566	2,19	0,456
0,1025	0,2420	2,40	0,2180	2,13	0,470
0,0875	0,2030	2,54	0,1771	2,02	0,494
(0,0725)	(0,1650)	(2,86)	(0,1364)	(1,88)	(0,532)
(0,0605)	(0,1330)	(3,16)	(0,1014)	(1,68)	(0,597)
(0,0490)	(0,1040)	(3,55)	(0,0685)	(1,40)	(0,715)

der Milchsäure in der wässerigen Lösung ist hierbei in der früher angegebenen Weise rechnerisch berücksichtigt worden.

6. Verteilung von anhydridfreier Milchsäure zwischen Amylalkohol und 0,5 n Schwefelsäure.

In der in Tabelle VI enthaltenen Versuchsreihe wurde die elektrolytische Dissoziation der Milchsäure wie bei den entsprechenden Verteilungsversuchen zwischen Wasser und Äther durch 0,5 n Schwefelsäure praktisch vollkommen zurückgedrängt. Wie man sieht, ist die Konstanz der Werte für $\frac{c_a}{c_w}$ bzw. $\frac{c_w}{c_a}$ befriedigend.

Tabelle VI.

Verteilungskoeffizient von anhydridfreier Milchsäure zwischen 0,5 n Schwefelsäure und Amylalkohol bei 20 ± 0,05°.

1	2	3	4
Gesamtkonzentration der Milchsäure		Verteilungskoeffizient	
in amylalkoholischer Schicht c_a Mol/Liter	in 0,5 n Schwefelsäure c_w Mol/Liter	$\frac{c_w}{c_a}$	$\frac{c_a}{c_w} = f$
0,2940	0,6980	2,37	0,421
0,2800	0,6640	2,37	0,422
0,2660	0,6310	2,37	0,422
0,2520	0,5950	2,36	0,424
0,2450	0,5640	2,35	0,426
0,2235	0,5260	2,35	0,427
0,2100	0,4940	2,35	0,425
0,1950	0,4580	2,35	0,426
0,1825	0,4260	2,34	0,429
0,1675	0,3905	2,33	0,429
0,1525	0,3560	2,33	0,428
0,1390	0,3230	2,32	0,430
0,1250	0,2890	2,31	0,433
0,1100	0,2530	2,30	0,435
0,0950	0,2170	2,22	0,438
0,0825	0,1830	2,22	0,451
0,0680	0,1490	2,19	0,456
0,0560	0,1240	2,21	0,450
0,0455	0,1000	2,20	0,455
0,0320	0,0705	2,15	0,454
0,0190	0,0410	2,15	0,463

7. Verteilung der Handelsmilchsäure zwischen Amylalkohol und Wasser.

Die Milchsäure des Handels ist immer anhydridhaltig, und zwar enthält die 90%ige Säure, wie *R. Dietzel* und *R. Krug*[1]) auf optischem Wege nachgewiesen haben, etwa 30% Lactylmilchsäure [$CH_3 . CH(OH) . COOCH(CH_3) . COOH$]. Andere Anhydride kommen nicht vor. Um den Einfluß der Lactylmilchsäure auf das Verteilungsverhältnis kennenzulernen, wurden einige Verteilungsversuche mit zwei verschiedenen Handelsmilchsäuren angestellt. Die Ergebnisse der mit Milchsäure D. A. B. V (*Byk-Guldenwerke*) und Milchsäure Pharmakopoe G. 5 (*Boehringer-Sohn*) ausgeführten Verteilungsversuche finden sich in den Tabellen VII und VIII. Es geht daraus hervor, daß die Werte für die Verteilungskoeffizienten sehr erheblich von denjenigen der anhydridfreien Milchsäure abweichen. So beträgt z. B. der Verteilungs-

[1]) *R. Dietzel* und *R. Krug*, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **58**, 1307, 1925

Tabelle VII. Verteilungskoeffizient von Milchsäure D. A. B. V (*C. H. Boehringer-Sohn*) zwischen Wasser und Amylalkohol bei 20 ± 0,05°.

1	2	3	4	5	6
Gesamtkonzentration der Milchsäure		Dissoziationsgrad $\alpha \cdot 10^2$	Konzentration der undissoziierten Milchsäure in wässeriger Schicht c_w Mol/Liter	Verteilungskoeffizient	
in amylalkoholischer Schicht c_a Mol/Liter	in wässeriger Schicht c'_w Mol/Liter			$\frac{c_w}{c_a}$	$\frac{c_a}{c_w} = f$
0,3160	0,5720	1,61	0,5559	1,76	0,568
0,3180	0,5680	1,61	0,5529	1,74	0,578
0,3170	0,5700	1,61	0,5539	1,75	0,572
0,2620	0,4740	1,75	0,4565	1,74	0,574
0,2630	0,4770	1,75	0,4595	1,75	0,572
0,2630	0,4750	1,75	0,4585	1,74	0,574
0,1973	0,3625	1,99	0,3426	1,74	0,576
0,1310	0,2436	2,38	0,2198	1,68	0,596
0,1310	0,2445	2,38	0,2207	1,69	0,594
0,1310	0,2455	2,38	0,2217	1,69	0,591
0,0693	0,1324	3,18	0,1006	1,45	0,689
0,0695	0,1324	3,18	0,1006	1,45	0,691
0,0693	0,1340	3,18	0,1022	1,48	0,678

Tabelle VIII. Verteilungskoeffizient von Milchsäure D. A. B. V (*Byk-Guldenwerke*) zwischen Wasser und Amylalkohol bei 20 ± 0,05°.

1	2	3	4	5	6
Gesamtkonzentration der Milchsäure		Dissoziationsgrad $\alpha \cdot 10^2$	Konzentration der undissoziierten Milchsäure in wässeriger Schicht c_w Mol/Liter	Verteilungskoeffizient	
in amylalkoholischer Schicht c_a Mol/Liter	in wässeriger Schicht c'_w Mol/Liter			$\frac{c_w}{c_a}$	$\frac{c_a}{c_w} = f$
0,3276	0,5842	1,58	0,5684	1,74	0,576
0,3290	0,5852	1,58	0,5694	1,73	0,578
0,3282	0,5850	1,58	0,5692	1,73	0,577
0,2735	0,4912	1,72	0,4740	1,73	0,577
0,2740	0,4918	1,72	0,4746	1,73	0,577
0,2740	0,4912	1,72	0,4740	1,73	0,577
0,1970	0,3590	2,00	0,3390	1,72	0,581
0,1960	0,3586	2,00	0,3386	1,73	0,579
0,1970	0,3600	2,00	0,3400	1,73	0,579
0,1320	0,2468	2,37	0,2231	1,69	0,592
0,1325	0,2474	2,37	0,2237	1,69	0,592
0,1315	0,2474	2,37	0,2237	1,66	0,602

koeffizient der anhydridfreien Milchsäure bei der Konzentration 0,5700 Mol/Liter $\frac{c_w}{c_a} = 2{,}39$, derjenige der Handelsmilchsäure dagegen $\frac{c_w}{c_a} = 1{,}75$. Es ist daraus zu schließen, daß die Lactylmilchsäure einen erheblichen Einfluß auf das Verteilungsverhältnis ausübt.

8. Zusammenfassung.

1. Der Verteilungskoeffizient der anhydridfreien Milchsäure zwischen Wasser und Äther wurde bei 20° für Konzentrationen bis etwa 1 Mol/Liter bestimmt. Auch bei rechnerischer Berücksichtigung der elektrolytischen Dissoziation der Milchsäure in Wasser ist der Verteilungskoeffizient der undissoziierten Milchsäure nicht konstant, sondern abhängig von der Konzentration. Er fällt von 11,3 bei $c_w = 0{,}9310$ Mol/Liter bis 8,70 bei $c_w = 0{,}2010$ Mol/Liter.

2. Der Verteilungskoeffizient von anhydridfreier Milchsäure zwischen Äther und 0,5 n Schwefelsäure (praktisch vollständige Zurückdrängung der elektrolytischen Dissoziation der Milchsäure in der wässerigen Phase) wurde in gleicher Weise bei 20° in etwa dem gleichen Konzentrationsbereich ermittelt. Er wurde dabei ebenfalls von der Konzentration der Milchsäure in der wässerigen Phase abhängig und etwas zugunsten des Äthers erhöht gefunden.

3. Ähnliche Resultate ergab die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten der anhydridfreien Milchsäure zwischen Wasser und Amylalkohol. Er ist wegen der größeren Löslichkeit der wässerigen Lösungen von Milchsäure in Amylalkohol wesentlich günstiger. Bei rechnerischer Berücksichtigung der elektrolytischen Dissoziation der Milchsäure in der wässerigen Phase schwankt er zwischen 2,42 ($c_w = 0{,}7560$ Mol/Liter) und 2,13 ($c_w = 0{,}2420$ Mol/Liter), bei vollständiger Zurückdrängung der Dissoziation der Milchsäure durch verdünnte Schwefelsäure zwischen 2,37 ($c_w = 0{,}6980$ Mol/Liter) und 2,15 ($c_w = 0{,}0410$ Mol/Liter).

4. Der Einfluß des in der Handelsmilchsäure vorhandenen Anhydrids (Lactylmilchsäure) auf das Verteilungsverhältnis ist sehr erheblich. Während beispielsweise der Verteilungskoeffizient bei $c_w = 0{,}5700$ Mol/Liter $\frac{c_w}{c_a} = 2{,}39$ beträgt, hat derjenige der Handelsmilchsäure bei derselben Konzentration den Wert von $\frac{c_w}{c_a} = 1{,}75$.

5. Der Einfluß der Temperatur auf den Verteilungskoeffizienten der Milchsäure zwischen Wasser und Äther ist gering.

Über das Verhalten der Leber unter Luftverdünnung.

Nach mit *G. Cronheim* ausgeführten Versuchen von

A. Loewy (Davos).

(Aus dem Schweizerischen Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung in Davos.)

(Eingegangen am 5. April 1927.)

In Versuchen, die im Davoser Forschungsinstitut von *A. Rosin*[1]) über das morphologische Verhalten der Organe von Tieren, die mehrere — bis zu 5 — Tage unter starker Luftverdünnung gehalten waren, angestellt wurden, hatte sich ergeben, daß, während die Luftverdünnung bei Mäusen wenig deutliche Veränderungen hervorbrachte, bei Meerschweinchen typische Veränderungen gefunden wurden, die bei einem Aufenthalt von 2 bis 3 Tagen unter Luftverdünnungen auf 280 bis 230, im Mittel 250 mm Barometerdruck, entsprechend etwa 8500 m Höhe, in Verfettungen, die zum Teil, besonders am Herzen, außerordentlich stark waren, bestanden; bei weiterem Aufenthalt bis zu im ganzen 5½ Tagen in der besonders eingehend studierten Leber zu parenchymatösen Degenerationen der Leberläppchenzentra führten.

Diese Untersuchungen sind nun an Meerschweinchen und bunten Ratten fortgesetzt worden, nach der histologischen und besonders nach der chemischen Seite hin, um, wenn möglich, die als Verfettung sich darstellenden Vorgänge in der Leber genauer zu analysieren. Zur Verdünnung benutzt wurde derselbe Apparat, den schon *Laubender* und *Rosin* verwendet hatten, und der von *Laubender* beschrieben wurde[2]). Bei den Ratten wurden zugleich normale Kontrolltiere untersucht, weiterhin trächtige Tiere und ein Hungertier; bei den Meerschweinchen, als Ergänzung der Luftverdünnungswirkung, gemästete Tiere und ein Hungertier. Daneben kamen die Lebern gemästeter Kälber und zweier Gänse sowie unter Luftverdünnung gehaltener Hühner zur Untersuchung, worüber weiterhin berichtet werden wird.

---

1) *A. Rosin*, Beitr. z. pathol. Anat. usw. **76**, 153, 1926.
2) *W. Laubender*, diese Zeitschr. **162**, 459, 1925.



Die Bestimmungen erstreckten sich auf das Gewicht der Lebern absolut und im Verhältnis zum Körpergewicht, auf ihren Wassergehalt, auf die Menge und den Phosphorgehalt des Ätherextrakts und auf die verschiedenen Stickstofffraktionen und den Phosphorgehalt des mit Äther extrahierten Gewebsrückstandes.

Von den aus dem Körper entnommenen Lebern wurde ein kleiner Teil zur Bestimmung des Wassergehalts unter Erwärmung auf 50 bis 55° im Trockenschrank benutzt. Der Leberrest wurde getrocknet, staubfein zerrieben und im Soxhletapparat mit Äther extrahiert. Die Gewichtsdifferenz vor und nach der Extraktion ergibt die Menge des Ätherextrakts. Dieser wird nach Abdampfen des Äthers in einem Mikrokjeldahlkolben mit konzentrierter Salpetersäure und Perhydrol (*Merck*) verascht. Der in ihm enthaltene Phosphor wird dabei zu Phosphorsäure oxydiert, die nach der gravimetrischen Mikromethode von *Embden* bestimmt wurde. In dem extrahierten Leberrückstand wurde dann gleichfalls nach Veraschung mit Salpetersäure und Perhydrol die Phosphorsäure ermittelt.

Zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs in der Lebertrockensubstanz, sowie des Reststickstoffs und seiner Komponenten wurde das von *Laubender* angewandte Verfahren befolgt[1]).

Zur Untersuchung kamen von Meerschweinchen und Ratten, über die allein hier berichtet werden soll, für die Luftverdünnung sieben Meerschweinchen und elf Ratten. Von letzteren waren drei thyreoidektomiert. Die Luftverdünnung entsprach im Mittel etwa 250 mm Barometerdruck. Die genaueren Werte für die einzelnen Tiere, ebenso die Dauer der Luftverdünnung ergeben sich aus den folgenden Protokollen sowie aus den Tabellen. Ferner wurden ohne Luftverdünnung untersucht: zwei Meerschweinchen nach Mästung, ein Hungermeerschweinchen; vier normale und zwei trächtige Ratten, eine thyreoidectomierte Ratte, eine Hungerratte.

Zunächst sei eine kurze Zusammenstellung der Versuchsbedingungen für die einzelnen Tiere gegeben, ihres allgemeinen Verhaltens, des Ganges ihrer Körpergewichte, ihrer Körpertemperaturen und der Sektionsbefunde. — Das histologische Verhalten der Lebern ist nur mit einigen Worten erwähnt, da darüber gesondert anderenorts von *Rosin* berichtet werden wird.

Protokolle.

Meerschweinchen 1. Maximale Luftverdünnung auf 340 mm Hg in 25 Minuten erreicht. Nach 24 Stunden Unterdruck für 5 Minuten aufgehoben zwecks Einbringen von Futter in die Kammer. Das Futter (Karotte) wird bis zur Erreichung eines Druckes von 390 mm Hg gefressen, dann Zerbeißen der Karotte, Kaubewegungen ohne Schluckbewegung; nach Aufenthalt von einigen Stunden unter Luftverdünnung beginnt das Tier wieder zu fressen. Neuerliche Unterbrechung der Verdünnung 7 Stunden nach der ersten. Zum Schluß des Versuchs von 48 Stunden Dauer ist das Tier

[1]) *Laubender*, diese Zeitschr. **165**, 430, 1925.

munter, im Gegensatz zu seinem anfangs ruhigen Verhalten. Nach der Herausnahme Körpertemperatur im Rektum 37,25°. Das Tier wird durch Halsschnitt entblutet. Gewicht des Tieres im Beginn 370 g, am Schluß 300 g. Abnahme 70 g. Die Leber ist makroskopisch nicht deutlich verfettet, ebensowenig das Herz; Nierenrinde blaß und etwas gelblich gefärbt. Gewicht der Leber 8 g.

Meerschweinchen 2. Erreicht einen Barometerdruck von 340 mm Hg in 10 Minuten. Tier sitzt matt und mit geschlossenen Augen da; auch nach 16 Stunden sitzt es noch immer mit halb geschlossenen Augen ruhig da. Es wird nun für eine halbe Stunde aus dem Apparat genommen. Körpertemperatur 35,75°. Nach dem Wiedereinsetzen steigt der Unterdruck in 10 Minuten auf 260 mm Hg und bleibt so. Tier zunächst munter. Nach 2 Stunden matt, nach 10 Stunden tot aufgefunden. Gewicht 360 : 320 g = 40 g Abnahme. Die Sektion ergibt: Leber nicht deutlich fettig entartet, aber auffallend hart. Gewicht 12,6 g. Gallenblase stark gefüllt. Dauer des Versuchs 24 Stunden. Histologischer Befund: *Leber* geringe zentrale Hyperämie, teilweise starke zentrale Verfettung.

Meerschweinchen 3. Barometerdruck sinkt in 10 Minuten auf 260 mm Hg. Tier liegt dabei auf der Seite, Augen halb geschlossen, Zuckungen der Körpermuskulatur. Nach 2 Stunden Tier erholter, aber doch noch schwach; kann sich nur mit Schwierigkeit aufrichten. 12 Stunden nach Versuchsbeginn in sterbendem Zustande aus dem Apparat genommen. Körpertemperatur 22° C. An der Leber äußerlich nichts wahrzunehmen. Gewicht 12,25 g. Gallenblase halb gefüllt. Dauer 12 Stunden. Histologischer Befund: *Leber*: Verfettung einzelner Zellen, sonst ohne Befund.

Meerschweinchen 4. Erreicht in 10 Minuten einen Barometerdruck von 280 mm Hg. Liegt dabei zunächst auf der Seite, um sich später wieder aufzurichten und in sitzender Stellung zu bleiben. Nach 24 Stunden für 25 Minuten aus der Verdünnung genommen; das Tier nimmt dabei keine Nahrung zu sich. Körpergewicht 430 g (Gewichtsverlust 60 g). Körpertemperatur 33,2°. Wieder eingesetzt für weitere 10 Stunden. (Das Barometer geht zeitweilig hinunter bis auf 220 mm Hg.) 3 Stunden nach dem Wiedereinsetzen ist das Tier munter, Atmung dauernd langsam und tief. Zum Schluß — Dauer 36 Stunden — Körpertemperatur 34,1°, Körpergewicht 410 gegen 490 = — 80 g. Sektionsprotokoll: Leber stark gelb gefärbt, weich, etwas matsch (verfettet). Herz statt dunkelrot gelbrot, schlaff. Nierenrinde gelblich gefärbt. Gallenblase sehr stark gefüllt. Gewicht der Leber 15,8 g. Histologischer Befund: Leber, fleckförmige Verfettung ohne typische Anordnung. Fleckförmige Ablagerung von Glykogen ohne typische Anordnung.

Meerschweinchen 5. Das Tier sitzt in den ersten 36 Stunden unter denselben Bedingungen wie Nr. 4, ist dabei aber munter. Körpertemperatur nach 24 Stunden 36,5°. Körpergewicht 400 g. Nach weiteren 10 Stunden Körpertemperatur 35,3°, Körpergewicht 369 g. Nach 36 Stunden für 20 Minuten aus dem Apparat genommen, dann wieder erneut unter Verdünnung gesetzt. Nach 12 Stunden nochmals für 20 Minuten herausgenommen, nach weiteren 12 Stunden entblutet. Körpertemperatur 35,6°, Körpergewicht 320 g gegen 480 g im Beginn. Abnahme 160 g. Der Barometerdruck stieg während der dem Versuchsende vorausgegangenen Nacht auf 540 mm Hg. In den Stunden vor dem Tode sank das Barometer vorübergehend auf 230 mm Hg; das Tier war trotz der starken Verdünnung munter geblieben. Dauer 60 Stunden.

Leber großenteils verfettet, weich; Gewicht 17,2 g. Gallenblase sehr stark gefüllt. Nierenrinde gelblich, aber weniger als bei Nr. 4; Gewicht der Nieren 3,6 g. Herz schlaff, nicht normal dunkelrot, sondern gelbrot.

Histologischer Befund: Leber, zentrale Verfettung, periphere starke Glykogenablagerung.

Meerschweinchen 6. Barometerdruck von 260 mm Hg in 10 Minuten erreicht, sinkt später vorübergehend auf 230 mm Hg. Körpergewicht nach 10 Stunden 420 g, Körpertemperatur 35,8°. Trotz der starken Verdünnung war das Tier munter. Kommt nach 20 Minuten wieder unter dieselbe Verdünnung, die bis zum Schluß anhält. Nach Herausnahme Körpertemperatur 35,0°. Körpergewicht sank von 456 auf 364 g. Abnahme 92 g. Versuchsdauer 48 Stunden. Die Sektion ergibt: Leber stark verfettet, weich; Gewicht 19,2 g. Gallenblase gut gefüllt. Niere auf Schnittfläche weißlich, Rinde setzt sich schlecht vom Mark ab; Gewicht der Nieren 3,6 g. Herz gelbrot, schlaff. Histologischer Befund: Leber ziemlich starke periphere Glykogenablagerung.

Meerschweinchen 7. Das Tier kommt unter einem Barometerdruck von 250 mm Hg. Wird nach 36 Stunden auf kurze Zeit aus dem Apparat genommen. Körpergewicht 461 g. Das Tier war zuvor munter und fraß im Apparat. Am dritten Versuchstage steigt das Barometer für einige Stunden auf 305 mm Hg, am vierten Tage vorübergehend auf 300 mm Hg. Körpertemperatur nach 84stündigem Aufenthalt 35,6°. Tier blieb weiter munter und fraß. Während der letzten Versuchsstunden stieg das Barometer vorübergehend auf 390 mm Hg. Körpertemperatur am Schluß 36,2°, Körpergewicht sank von 530 auf 348 g. Verlust 182 g in 108 Stunden.

Leber äußerst weich, gelb gefärbt, sehr stark verfettet; Oberfläche eigentümlich körnig; Gewicht 24,3 g. Gallenblase mäßig stark gefüllt. Herz schlaff, gelbrot; Gewicht 1,6 g. Nierenrinde deutlich von Mark abgehoben, Mark rötlich, Rinde weiß; Gewicht der Nieren 3,9 g. Histologischer Befund: Leber hochgradige zentrale Verfettung, zentrale Nekrosen, stellenweise Hyperämie, diffuse Ablagerung von Glykogen teilweise zusammen mit Fett in derselben Zelle.

Meerschweinchen 8. (Mastmeerschweinchen). Anfangsgewicht 478 g. Erhält reichlich Hafer und Milch, zeitweilig auch Rüben. Das Körpergewicht ändert sich dadurch folgendermaßen:

am	2.	Tage	502 g	am	8.	Tage	509 g
„	3.	„	546 g	„	9.	„	479 g
„	4.	„	514 g	„	10.	„	474 g
„	6.	„	518 g	„	11.	„	523 g
„	7.	„	554 g	„	13.	„	534 g

Danach wird das Tier entblutet. Körpertemperatur 39,0°.

Leber allgemein graurot, enthält stecknadelkopfgroße gelbe Flecke, weicher als normal, 41,5 g. Gallenblase mittel gefüllt. Herz 1,85 g; hellgraurot. Nieren graurot, auf Schnittfläche Rinde braunrot, Mark graugelb, gelblich abgesetzt; linke Niere 2,1 g, rechte 2,25 g. Linke Nebenniere 0,2 g. Lungen normal hell, 4 g. Milz graurot, heller als normal. Hoden + Nebenhoden links 2 g, rechts 2,1 g.

Histologischer Befund: Leber diffuse starke Glykogeninfiltration, kein Fett.

Meerschweinchen 9 (Masttier). Anfangsgewicht 307 g. Erhält reichlich Hafer und Milch. Das Körpergewicht steigt dadurch nach 2 Tagen auf 315 g, am dritten Tage auf 351 g. Am vierten Tage fällt es auf 341 g, um am fünften Tage wieder auf 355 g zu steigen. Am fünften Tage entblutet. Die Sektion ergibt: Leber abnorm weich, leicht zerreißlich, Aussehen graurot; Gewicht 15,7 g. Gallenblase sehr stark gefüllt. Nieren von normalem Aussehen; Gewicht 3,6 g. Herz normal, Gewicht 1,5 g. Milz 0,5 g, hellbraunrot. Lunge 3 g, normal luftgefüllt.

Histologischer Befund: Leber wie bei Tier 8.

Meerschweinchen 10. (Hungertier). Das Tier hungert 3 Tage und wird danach entblutet. Körpertemperatur 38,1°. Leber derb, braunrot; Gewicht 9,5 g. Nierenrinde braunrot, Mark graurot, deutlich abgesetzt; Gewicht der Nieren 3,4 g. Herz normal braunrot, derb; Gewicht 1,25 g. Lungen teilweise blutgefüllt (Aspiration), sonst lufthaltig; Gewicht 3,9 g. Milz verhältnismäßig klein, hellbraunrot; Gewicht 0,3 g.

Histologischer Befund: Leber kein Fett, Glykogen nur in vereinzelten Zellen.

Ratten 1, 3, 4, 8. Männliche Tiere. Nr. 1, 3, 4 sterben sofort bei Erreichen von 250 mm Hg, 10 Minuten nach Beginn der Verdünnung. Nr. 8 nach Aufenthalt von einer Stunde unter 340 mm Hg gestorben. Werden als Kontrolltiere verarbeitet. Gewicht der Leber:

Nr. 1:	7,1 g	=	3,25%	des Körpergewichts
„ 3:	6,9 g	=	6,45%	„ „
„ 4:	5,3 g	=	6,63%	„ „
„ 8:	15,8 g	=	6,25%	„ „

Ratte 2. Weibliches Tier, trächtig. Gewicht 218 g. Stirbt 10 Minuten nach Beginn der Verdünnung bei 250 mm Hg. Leber stark gelb gefärbt; Gewicht 10,1 g.

Ratte 7. Weibliches Tier, trächtig. Gewicht 168 g. Bei einem Barometerdruck von 330 mm Hg eine Stunde nach Beginn der Verdünnung plötzlich gestorben. Leber stark gelb gefärbt, Gewicht 11,2 g.

Ratte 12. Unter Luftverdünnung 3 Tage. 24 Stunden bei 380 mm Hg, danach vorübergehender Wiederanstieg auf 540 mm Hg, Wiederverdünnung auf 340 mm Hg; nach einigen Stunden auf 290 mm Hg. Am zweiten Tage abermaliger Wiederanstieg auf 390 mm Hg, neue Verdünnung auf 290 bis 250 mm Hg am dritten Tage. Bei dieser langsam fortschreitenden Verdünnung bleiben die Tiere bis zum Schluß munter und beweglich. Während der letzten Stunden Anstieg des Druckes auf 550 mm Hg. Tod durch Entbluten. Gewichtsabnahme von 217 auf 174 = 43 g.

Leber mäßig verfettet; Gewicht 6,85 g. Gallenblase leer. Niere an der Oberfläche braunrot, weich; Rinde braunrot, Mark hell; Aussehen ganz anders als bei verdünnten Meerschweinchen; Gewicht der Nieren 1,7 g. Herz auf Schnittfläche braunrot, heller als normal; Gewicht 1 g.

Histologischer Befund: Leber fleckförmige Verfettung einzelner Zellen, ziemlich viel Glykogen in diffuser Verteilung.

Ratte 13. Während der ersten 3 Tage die gleichen Versuchsbedingungen wie bei Ratte 12. Dann für einige Stunden aus dem Apparat genommen. Neue Verdünnung in 10 Minuten bis auf 240 mm Hg. Das Tier bleibt dabei munter und hat 96 vertiefte Atemzüge in der Minute. Barometer-

druck bleibt bis zu Ende konstant. Körpertemperatur nach Herausnahme 35,8°, Körpergewicht 225 : 168 g, Abnahme 56 g. Während der letzten Tage saß das Tier ruhig in Schlafstellung (Kopf gesenkt, Schnauze zwischen den Vorderbeinen). Versuchsdauer 120 Stunden.

Leber makroskopisch nicht deutlich verfettet; Gewicht 7,2 g. Nierenrinde dunkelrot, Mark graurot; Gewicht der Nieren 1,5 g. Herz nicht verfettet; Gewicht 1 g. Gewicht der Lungen 1,75 g, der Milz 0,5 g, beides normal.

Histologischer Befund: Leber keine Verfettung, Glykogen vorhanden.

Ratte 14. Blutentnahme aus dem Schwanz um 9 Uhr. Beginn der Verdünnung um 3½ Uhr auf 420 mm Hg Barometerdruck für 17 Stunden. Dann Verdünnung auf 310 mm Hg für 5½ Stunden. Weitere Verdünnung auf 230 mm Hg für 45 Stunden. Unterbrechung der Verdünnung für 4½ Stunden, während derer Blut aus dem Schwanz entnommen wird. Danach wieder Verdünnung auf 220 mm Hg Barometerdruck. Der Barometerdruck geht für einige Stunden auf 390 mm Hg, wird für 3 Stunden erniedrigt auf 220 mm Hg. Danach Tier entblutet. Tier ist bis zum Schluß munter, bewegt sich umher, putzt sich. Körpertemperatur zum Schluß 27,7°. Versuchsdauer 96 Stunden. Körpergewichtsabnahme von 136 bis 103 = 33 g.

Leber derb, braunrot, keine sichtbare Verfettung wahrzunehmen; Gewicht 3,9 g. Herz braunrot, normal; 0,85 g. Nieren 1 g. Nierenrinde dunkel-braunrot, Mark heller braunrot, deutlich abgesetzt. Lunge normal luftgefüllt, 1 g. Milz auffallend groß, hell, braunrot, 0,5 g.

Histologischer Befund: Leber zentrale Hyperämie, starke zentrale Verfettung, kein Glykogen.

Ratte 15. Wird unter denselben Versuchsbedingungen wie Nr. 14 gehalten. Vor Beginn der Luftverdünnung Blutentnahme durch Herzpunktion. Tier lebt von Beginn der Verdünnung 89 Stunden; eine Stunde später tot gefunden.

Leber hart, dunkelrot, nichts von Verfettung sichtbar, 5,4 g. Herz derb, mit Gerinnsel erfüllt, 0,85 g. Niere dunkel braunrot, auf Schnittfläche ebenso, Mark hell braunrot, deutlich abgesetzt; Gewicht beider Nieren 1,3 g. Gallenblase leer. Lungen normal lufthaltig, 0,75 g? (0,9 g?). Milz auffallend schwarzrot, 0,65 g.

Histologischer Befund: Leber in einzelnen Zellen Spuren von Fett.

Ratte 16 (Hungerratte). Ratte hungert 72 Stunden und wird dann moribund entblutet. Körpergewichtsabnahme 102 bis 85 = 17 g.

Leber dunkel braunrot, weich, 1,75 g. Herz hell braunrot, 0,55 g. Niere hell braunrot, auf Schnittfläche Rinde ebenso, Mark weißlich, Grenze rötlich; Gewicht beider Nieren 1 g. Lungen normal lufthaltig, 0,9 g. Milz braunrot, dunkler als Niere und Herz, 0,3 g. Hoden abnorm groß; Gewicht eines Hodens 0,75 g.

Ratte 17 und *18.* Blutentnahme, dann Luftverdünnung auf 390 mm Hg Barometerdruck für 6 Stunden. Tier 17 bleibt dabei munter; Tier 18 ist matter, liegt meist schlafend auf dem Bauch. Atmung verlangsamt, nicht übermäßig tief. Verdünnung weiter auf 340 mm Hg für 13 Stunden. Dann weitere Druckverminderung auf 250 mm für 24 Stunden. Tiere bleiben dabei munter. Dann Verdünnung für 5 Minuten unterbrochen, Fütterung. Erneute Verdünnung auf 240 mm für 8 Stunden, darauf weitere Druckverminderung auf 200 mm. Mit einigen Schwankungen bleibt der Baro-

meterdruck 18 Stunden auf 200 mm Hg, dann Steigen des Barometerdruckes auf 390 mm. Öffnung der Verdünnungskammer zwecks neuer Abdichtung. Verdünnung auf 240 mm Hg in 15 Minuten. Nochmalige Öffnung der Kammer nach 2½ Stunden. Neue Verdünnung auf 200 mm Hg in 8 Minuten. Beide Tiere, besonders Nr. 18, sind jetzt auffallend unruhig, springen umher und werden nach 5 Minuten bei 190 mm Hg tot gefunden. Dauer des Versuchs 84 Stunden. Körpergewichtsabnahme bei Tier 17 84 bis 72 = 12 g, bei Tier 18 97 bis 81 = 16 g.

Tier 17. Leber 4,25 g, Herz 0,85 g, Nieren 1 g, Lunge 0,9 g, Milz 0,55 g, jeder Hoden 0,35 g.

Tier 18. Leber 5 g, Herz 0,75 g, Nieren 1 g, Lungen 0,8 g, Milz 0,45 g, beide Hoden 0,95 g. Die Sektionen mußten bei Lampenlicht vorgenommen werden, deshalb konnte über die Farbe der Organe nichts angegeben werden.

Ratte 19 und 20. Verdünnung auf 380 mm Hg Barometerdruck. Nach ½ Stunde hinauf auf 430 mm Hg, da beide Tiere auf der Seite liegen. Der Barometerdruck blieb so für 18 Stunden, dann erniedrigt auf 330 mm für 6 Stunden, weiter auf 290 mm für 14 Stunden. In den letzten Stunden dieser 14stündigen Periode Hinaufgehen auf 390 mm. Öffnung der Kammer, Fütterung. Erneute Verdünnung auf 200 bis 220 mm in 2 Stunden, die für 23 Stunden konstant blieb. Tier 19 danach tot gefunden. Tier 20 saß meist ruhig mit zeitweiligen Bewegungen. Öffnung und Herausnahme von Tier 19. Tier 20 unter erneute Verdünnung von durchschnittlich 260 mm Hg für 23 Stunden gesetzt. Bleibt nach Blutentnahme noch 15½ Stunden unter Normaldruck, dann Entblutung. Dauer bei Tier 19 61 Stunden, bei Tier 20 84 Stunden, Körpergewichtsabnahme bei Tier 19 123 bis 115 = 8 g, bei Tier 20 117 bis 112 = 5 g.

Tier 19. Leber dunkelbraunrot, an einzelnen Stellen beider Lappen schwache Gelbfärbung, 5,25 g. Herz mit Blutgerinnseln erfüllt, 0,65 g. Niere: Rinde und Mark blutreich, Gewicht beider Nieren 1,5 g. Milz im Verhältnis zur Milz anderer Ratten auffallend klein, blaßrot, nicht so dunkel wie sonst, 0,3 g. Hoden und Nebenhoden 0,9 g. Lungen 1,1 g. Es findet sich ein Emphysem.

Tier 20. Leber braunrötlich, ziemlich stark verfettet, 4,4 g. Herz hellbraunrot, gelb gesprenkelt, 0,6 g. Niere dunkelbraunrot, auf Schnittfläche Rinde ebenso, Mark blaß, gut abgesetzt. Gewicht beider Nieren 1 g. Lungen normal hell, lufthaltig, 0,9 g. Milz schwarzrot, auffallend groß, 0,5 g. Linker Hoden ohne Nebenhoden 0,65 g, rechter Hoden und Nebenhoden 0,75 g.

Ratten 21 bis 23. Bei allen drei Tieren Entfernung beider Schilddrüsen. Am Tage nach der Operation auffallend langsamer und steifbeiniger Gang der Tiere, die meist zusammengekauert dasitzen. Tier 22 zeigt zeitweilig allgemeine Zuckungen der Körpermuskulatur. Unter Fütterung mit Brot und Milch gehen die Erscheinungen am nächsten Tage zurück. 48 Stunden nach der Operation Blutentnahme aus dem Schwanze, dann unter Luftverdünnung gebracht, zunächst auf 400 mm Hg Barometerdruck für 20 Stunden. Dann nach Fütterung weitere Verdünnung auf 310 mm Hg für 5 Stunden und nach zeitweiligem Steigen des Barometers auf 480 mm Hg Herabsetzung des Druckes auf 270 mm für weitere 5 Stunden, wobei die Tiere munter sind und fressen. Während der nächsten 11 Stunden allmähliches Steigen des Barometerdrucks auf 480 mm Hg. Öffnen der Kammer,

Tabelle I. Organgewic

Tier	Luftverdünnung in Stunden	Körpergewicht g	Leber		Herz	
			Gewicht g	in % des Körpergewichts	Gewicht g	in % des Körpergewichts
Meerschwein 1	48	300	8,0	2,70		
„ 2	24	320	12,6	3,94		
„ 3	12	400	12,3	3,07		
„ 4	36	410	15,8	3,86		
„ 5	60	320	17,2	5,38		
„ 6	48	364	19,2	5,28		
„ 7	108	348	24,3	7,00	1,6	0,46
Mastmeerschwein 8		534	41,5	7,77	18,5	0,35
„ 9		355	15,7	4,42	1,5	0,42
Hungermeerschwein 10		349	9,5	2,72	1,25	0,36
Ratte 0, Normaltier		73	2,5	3,42	0,37	0,51
Ratten 1, 3, 4, 8, Normaltiere		658	35,1	5,34		
Ratte 2, trächtiges Tier		218	10,1	4,63		
„ 7, „ „		168	11,2	6,67		
„ 12, in Luftverdünnung	72	174	6,85	3,94	1,0	0,57
„ 13, „ „	120	168	7,2	4,29	1,0	0,59
„ 14, „ „	96	103	3,9	3,79	0,85	0,82
„ 15, „ „	89	96	5,4	5,63	0,85	0,89
„ 17, „ „	84	72	4,25	5,90	0,85	1,18
„ 18, „ „	84	81	5,0	6,17	0,75	0,93
„ 19, „ „	60	115	5,25	4,57	0,65	0,56
„ 20, „ „	84	112	4,4	3,93	0,6	0,54
Hungerratte 16		85	1,75	2,06	0,55	0,65
Ratte 21, thyreoidektomiertes Tier in Luftverdünnung	120	82	3,55	4,33	0,5	0,61
„ 22, Dasselbe	120	85	3,65	4,29	0,4	0,47
„ 23, „	120	75	3,8	5,07	0,55	0,67
„ 24, thyreoidektomiert	—	66	3,1	4,70	0,37	0,56

+ Bedeutet mit Nebenhoden bzw. Nebenniere.

untersuchten Tiere.

Nieren		Lungen		Milz		Hoden (beide)	
Gewicht g	in % des Körpergewichts	Gewicht g	in % des Körpergewichts	Gewicht g	in % des Körpergewichts	Gewicht g	in % des Körpergewichts
3,6	1,13						
3,6	0,99						
3,9	1,12						
L. 2,1 R. 2,25	0,29 0,42 } 0,81	4,0	0,75	0,8	0,16	L. 2,0^{+} R. 2,1^{+}	0,38 0,39 } 0,77
3,6	1,01	3,0	0,85	0,5	0,14		
3,4	0,98	3,9	1,12	0,3	0,09		
L. 0,37 R. 0,45	0,51 0,62 } 1,13	0,55	0,75	0,3	0,41	L. 0,2 R. 0,32^{+}	0,27 0,44 } 0,71
1,7	0,98						
1,5	0,89	1,75	1,04	0,5	0,28		
1,0	0,97	1,0	0,97	0,5	0,49		
1,3	1,36	0,75? 0,9?	0,78 0,94	0,65	0,68		
1,0	1,39	0,9	1,25	0,55	0,76	0,7	0,98
1,0	1,24	0,8	0,99	0,45	0,56	0,95	1,17
1,5	1,30	1,1	0,96	0,3	0,26	0,9^{+}	0,78
1,0	0,89	0,9	0,80	0,5	0,45	L. 0,65 R. 0,75^{+}	0,58 0,67 } 1,25
1,0	1,18	0,9	1,06	0,3	0,35	1,50	1,77
0,9	1,10	0,95	1,16	0,3	0,37	L. 0,35 R. 0,3	0,43 0,37 } 0,80
0,75	0,88	0,72	0,85	0,22	0,26	L. 0,62 R. 0,75^{+}	0,88 0,73 } 1,61
0,8	1,06	0,87	1,16	0,3	0,40	L. 0,29 R. 0,37^{+}	0,49 0,39 } 0,88
L. 0,36 R. 0,37^{+}	0,55 0,56 } 1,11	0,5	0,76	0,67	1,02	—	—

Fütterung. Erneute Verdünnung auf 230 mm Hg, die für 79 Stunden, d. h. bis zum Schluß, anhält. Entblutung. Versuchsdauer 120 Stunden. Körpergewichtsabnahmen bei Tier 21 96 bis 82 = 14 g, bei Tier 22 98 bis 85 = 13 g, bei Tier 23 84 bis 75 = 9 g.

Tier 21. Körpertemperatur 33,2° vor der Entblutung. Leber weicher als normal, hell braunrot, 3,55 g. Herz schlaff, hellbraunrot, 0,5 g. Nieren hellbraunrot, Rinde hell braunrot, etwas blaß, Mark hell graurot, setzt sich nicht deutlich ab; Gewicht jeder Niere 0,45 g. Lungen normal hell, lufthaltig, 0,95 g. Milz dunkel braunrot, nicht so schwarz wie bei früheren Tieren, 0,3 g. Rechter Hoden ohne Nebenhoden 0,3 g, linker Hoden ohne Nebenhoden 0,35 g. Keine Thyreoidea zu finden. Histologischer Befund: Leber keine Verfettung. Glykogen in diffuser Verteilung.

Tier 22. (Albino.) Das Tier macht vor der Tötung langsamere Bewegungen als die früheren Tiere. Hinterbeine etwas gespreizt aufgesetzt, keine deutlichen Spannungen, vielleicht etwas steif. Körpertemperatur 31,8° vor der Entblutung.

Leber hellbraunrot, heller als normal, weich, 3,65 g. Herz weich, braunrot, 0,4 g. Niere braunrot, Rinde auf Schnittfläche ebenso, Mark grau, Gewicht der Nieren 0,75 g. An Herz und Nieren keine Verfettungen zu sehen. Lungen normal hell, lufthaltig, 0,72 g. Milz dunkelbraunrot, aber nicht schwarzrot, 0,22 g. Rechter Hoden und Nebenhoden 0,75 g, linker Hoden ohne Nebenhoden 0,62 g; die Hoden sind weicher und kleiner als bei den nicht operierten Tieren. Thyreoidea nicht zu finden. Histologischer Befund: Leber keine Verfettung, Spuren von Glykogen.

Tier 23. Körpertemperatur vor dem Entbluten 34,7°. Leber hellbraunrot, weicher als normal, makroskopisch keine deutliche Verfettung. 3,8 g. Herz hellbraunrot, schlaff, 0,55 g. Nieren dunkel braunrot, Rinde auf Schnittfläche ebenso, Mark graurot, rechte Niere 0,4 g, linke Niere 0,4 g. Lungen normal lufthaltig, 0,87 g. Milz klein, braunrot, 0,3 g. Hoden deutlich kleiner als bei den Normaltieren; rechter Hoden + Nebenhoden 0,37 g, linker Hoden ohne Nebenhoden 0,29 g. Thyreoidea nicht zu finden. Histologischer Befund: Leber keine Verfettung, reichlich Glykogen.

Ratte 24. Entfernung beider Schilddrüsen. Außer einer gewissen Steifheit der Hinterbeine, ähnlich den Tieren 21 bis 23, äußerlich nichts zu sehen. Das Tier sitzt meist ruhig da. Nach 48 Stunden entblutet. Körpertemperatur 37°. Das Körpergewicht hat von 63 auf 66 g, also um 3 g zugenommen.

Leber gelbrot, heller und weicher als normal, makroskopisch nicht deutlich verfettet, 3,1 g. Herz normal, 0,37 g. Nieren braunrot, auf Schnittflächen Rinde hellbraunrot, Mark gelblich, nicht deutlich abgesetzt; linke Niere ohne Nebenniere 0,36 g, rechte Niere mit Nebenniere 0,37 g. Lungen normal, luftgefüllt, hell, 0,5 g. Milz auffallend schwarzrot, 0,67 g.

I.

Wie die Protokolle zeigen, wurde bei fast allen Tieren neben dem Körpergewicht und dem der besonders interessierenden Leber auch das einer Anzahl wichtiger Körperorgane bestimmt. Da in der Literatur kaum irgendwelches Material von den hier untersuchten Tierarten über den *Anteil der einzelnen Organe am Körpergewicht* vorliegt, seien die gefundenen Werte auf der folgenden Tabelle I wiedergegeben.

Für die Beurteilung der Tabelle sei aus den Angaben der Protokolle hervorgehoben, daß Meerschweinchen 2 bis 6 gehungert hatten; Nr. 1 und 7 hatten an einzelnen Tagen wenig Karotten gefressen, sind also als stark unterernährte Tiere zu betrachten. Die Ratten 12 bis 15 hungerten ebenfalls, während Nr. 17 bis 23 an einem oder an mehreren Tagen wenig Futter nahmen, aber auch unterernährt blieben. Die sogenannten Mastmeerschweinchen hatten nur verhältnismäßig wenig gefressen und demnach nicht viel zugenommen.

Auf ein näheres Eingehen auf die Einzelwerte der Tabelle möchte ich verzichten, da sie nur abseits der eigentlichen Ziele unserer Untersuchung einen Nebenbefund darstellen.

II.

Wichtiger erscheint der *Gang des Körpergewichts* während der Verdünnungszeit im Vergleich mit dem an nicht verdünnten, sonst gleich gehaltenen Tieren. Die Körpergewichte wurden wiederholt bestimmt, jedoch sollen der Raumersparnis wegen nur die Ergebnisse der Körpergewichtsabnahme, berechnet für je 12 Stunden, in Tabelle II angegeben werden.

Wie erwähnt, nahmen nur Meerschweinchen 1 und 7 wenig Karotten zu sich, deren Menge nicht bestimmt wurde, und zwar *nach* der Wägung. Die für sie berechneten Werte der Körpergewichtsabnahme von 4,66% (Tier 1) und 5,60% (Tier 7) stellen also Minimalwerte dar. Verglichen mit dem Gewichtsverlust der nicht unter Luftverdünnung gehaltenen Hungertiere ergibt sich ein weit stärkerer Verlust als bei diesen; der Gewebszerfall war also während der Luftverdünnung weit über den Hungerabbau hinaus erhöht, was um so bemerkenswerter ist, als die Körpertemperatur bei den unter niedrigem Barometerdruck gehaltenen Tieren abnorm erniedrigt war, also ohne die Wirkung der Luftverdünnung eine Beschränkung des Stoffwechsels und damit eine geringere Abnahme des Körpergewichts zu erwarten war. Im Mittel betrug der Gewichtsverlust für je 12 Stunden bei Meerschweinchen 2 bis 6 *5,68*% des Körpergewichts, bei Hinzunahme auch von Tier 1 und 7 fast ebensoviel: *5,50*%. Demgegenüber stellt sich der Verlust bei den drei Hungertieren zu *3,92*%.

Für die Realität des bei Luftverdünnung stärkeren Gewichtsabfalls spricht auch die Tatsache, daß die Tiere unter Luftverdünnung ganz ruhig saßen, während die Hungertiere lebhafte Bewegungen zum Futtersuchen ausführten.

Laubender[1]) hatte bei seinen analogen Versuchen eine geringere Gewichtsabnahme der unter Verdünnung gehaltenen Meerschweinchen gefunden als bei den ohne diese hungernden. Jedoch waren die Verdünnungsgrade viel geringer als in unseren Versuchen, nämlich sie gingen

[1]) *W. Laubender*, diese Zeitschr. **162**, 459, 1925.



Tabelle II. Gang des Körpergewichts.

Tier	Versuchsdauer in Stunden	Körpergewicht		Durchschnittliche Gewichtsabnahme in 12 Stunden		Bemerkungen
		am Beginn g	am Ende g	g	% des Körpergewichts	
				Meerschweinchen.		
1	48	370	300	17,25	4,66	Frißt zeitweise etwas Karotten
2	24	360	320	20,00	5,56	hungert
3	0	400	—	—	—	„
4	36	490	410	26,67	5,44	„
5	60	480	320	32,00	6,67	„
6	48	456	364	23,00	5,04	„
7	108	530	348	29,67	5,60	Frißt zeitweise etwas Karotten
8	324	478	526	—	—	Masttier
9	156	307	355	—	—	„
10	72	470	349	20,17	4,31	Hungertiere (Kontrollen) 10–12
11	64	550	435	21,6	4,08	Tiere 1–7 in Luftverdünnung
12	64	555	455	18,7	3,37	
				Ratten.		
12	72	217	174	7,17	3,30	Kein Futter
13	120	225	168	5,70	2,53	„
14	96	136	103	4,13	3,04	„
15	96	133	96	4,63	3,48	„
16	72	102	85	2,83	2,77	Hungertier (Kontrolle)
17	84	84	72	1,71	2,04	Frißt zeitweise etwas
18	84	97	81	2,57	2,65	„
19	72	123	115	1,33	1,11	„
20	84	117	105	1,71	1,46	„
21	120	96	82	1,40	1,43	„ } Thyreoidektomiert
22	120	98	85	1,30	1,33	„ } Thyreoidektomiert
23	120	84	75	0,90	1,07	„ } Thyreoidektomiert
24	48	63	66	—	—	Thyreoidektomierte Kontrolle Tiere 12–15 und 17–23 in Luftverdünnung

nur auf 430 bis 380 mm Barometerdruck, entsprechend 4500 bis 5500 m Höhe. Mit diesen geringeren Gewichtsabnahmen stimmt die Einschränkung des Gaswechsels, die *Laubender* fand, überein. Auffallen müßte die bei uns gefundene abnorm starke, die Werte im gewöhnlichen Hunger übertreffende Gewichtsabnahme, trotzdem Versuche darüber vorliegen, daß bei Vögeln und Säugetieren mit fortschreitender Luftverdünnung der Gaswechsel weiter sinkt. Jedoch muß in Betracht gezogen werden, daß unter Verdünnungsgraden, wie wir sie wählten, der Stoffwechsel pathologisch abläuft, und daß die Gaswechselwerte nicht mehr als sicheres Maß für den Stoffumsatz gelten können. Die Divergenz zwischen dem Gange des Gaswechsels und dem Verlaufe des Körpergewichts kann also eine scheinbare sein. Hierüber werden weitere Versuche Aufschluß bringen.

Nicht ganz so durchsichtig stellen sich die Verhältnisse bei den *Ratten* dar. Unter den vier ersten ohne Futter unter Luftverdünnung gehaltenen (Nr. 12 bis 15) nimmt nur *eine* etwas weniger ab als das Hungertier 16, die anderen stärker. Die Abnahme beträgt im Mittel der vier verdünnten Ratten *3,09* gegen *2,77* % bei der Hungerratte. Die übrigen Ratten nahmen etwas Futter, aber, wie der Abfall des Körpergewichts zeigt, zu wenig für ihren Bedarf. Die für diese Ratten berechneten Werte sind, wie bei den Meerschweinchen, Minimalwerte. Alle Gewichtsverluste sind scheinbar geringer als beim Hungertier und liegen bei den thyreoidektomierten ausnahmslos sehr niedrig. Man kann dies jedoch nicht mit der Herabsetzung des Stoffwechsels durch die Entfernung der Schilddrüse in unmittelbare Verbindung bringen, da die verzehrten Nahrungsmengen unbekannt sind.

III.

Eine besondere Wirkung der Luftverdünnung betrifft die *Wärmeregulationsverhältnisse.* Bei allen daraufhin untersuchten Tieren war am Schluß des Aufenthalts unter Luftverdünnung die Körpertemperatur stark, zum Teil außerordentlich stark gesunken. Bei Luftfahrern und Bergsteigern sind Senkungen der Körpertemperatur gefunden worden. Jedoch sind die Bedingungen, unter denen sie zustande kamen, zu undurchsichtig, um weitere Schlüsse daraus ziehen zu lassen. Dagegen hat schon *Paul Bert*[1]) darauf hingewiesen, daß dasselbe Verhalten sich auch an Laboratoriumstieren, die unter Sauerstoffmangel gehalten werden, findet. Er hatte es in geringem Maße an Hunden, in höherem an Vögeln, Kaninchen, Meerschweinchen gefunden. Bei uns ist es an einem einheitlichen Material erhärtet. Die Werte finden sich auf Tabelle III, zu der zu bemerken wäre, daß die normale Rektumtemperatur bei Meerschweinchen selten zwischen 38,0 und 38,5°, meist zwischen 38,5 und 39,0° liegt, bei Ratten um 39°.

Bei Meerschweinchen, die nicht in die Tabelle mit aufgenommen sind, wurden Körpertemperaturen von nur 31° gefunden.

Hinsichtlich der Deutung der Erscheinung sei darauf hingewiesen, daß der Verdünnungsapparat so weit ventiliert wurde, daß keine tropfenförmige Kondensation von Wasser in ihm stattfand und die Tiere zum Schluß nicht feucht waren. Damit nicht der Luftwechsel selbst zur Abkühlung führte, wurde der Raum, in dem der Verdünnungsapparat stand, geheizt, so daß in ihm eine Temperatur zwischen 20 bis 25° C herrschte. Aus äußeren Ursachen kann der Temperaturabfall sich also nicht erklären, man muß vielmehr sein Entstehen aus Störungen der Wärmeregulierung infolge von Stoffwechselstörungen herleiten. Um welche Stoffwechselstörungen es sich handelt, wird später erörtert werden.

[1]) *Paul Bert*, La pression barométrique, Paris 1878, S. 536ff. und 705ff.

Tabelle III.

Körpertemperatur.

Meerschweinchen				Ratten			
Tier Nr.	Dauer der Verdünnung Stunden	Körpertemperatur in ano °C	Bemerkungen	Tier Nr.	Dauer der Verdünnung Stunden	Körpertemperatur in ano °C	Bemerkungen
1	48	37,25		13	120	35,8	
2	24	35,75		14	96	27,7	
3	12	22,0	sterbend				
4	36	34,1					
5	24	36,5					
	34	35,3		21	120	33,2	Schilddrüse entfernt
	60	35,6					
6	10	35,8					
	48	35,0		22	120	31,8	Schilddrüse entfernt
7	84	35,6					
	108	36,2		23	120	34,7	Schilddrüse entfernt
9	—	39,0	Masttier				
10	—	38,1	72 Stunden Hunger	24	—	37,0	Schilddrüse entfernt, nicht i. Luftverdünnung

IV.

Die chemische Zusammensetzung der Leber.

A. *Der Wassergehalt* liegt bei den unter Luftverdünnung gehaltenen und dabei hungernden oder unterernährten Meerschweinchen auf der Höhe des Hungertieres 10, wie die Haupttabelle am Schluß der Arbeit ergibt.

Bei den gefütterten (Nr. 8 und 9) Meerschweinchen liegt er niedriger, nämlich 70,18% gegen 73,33% bei den ersteren. Dabei enthalten die gefütterten Tiere weit weniger an Ätherextrakt als die luftverdünnten Tiere (vgl. Haupttabelle am Schluß). Ein Einfluß der Verdünnung als solcher auf den Wassergehalt der Leber bzw. auf deren Trockensubstanz ist nicht zu erkennen, obwohl er theoretisch vorhanden sein sollte.

Bei den Ratten liegen die Verhältnisse komplizierter. Während alle Meerschweinchen durch Entbluten getötet wurden, kamen von den Ratten auch solche zur Untersuchung, die während der Verdünnung gestorben waren. Dahin gehören nicht nur die Tiere 15 bis 19, sondern auch die Normaltiere 1, 3, 4, 8, die 6 Minuten bzw. 1 Stunde nach Beginn der Verdünnung infolge zu schneller Herabsetzung des Luftdrucks starben, und die beiden trächtigen Tiere Nr. 2 und 7. Die übrigen wurden entblutet. Nun zeigt sich, daß der Wassergehalt der am dritten bis vierten Verdünnungstage gestorbenen Tiere (Nr. 15 bis 19) im Mittel 72,43% beträgt und fast ebensoviel bei den sogleich im Beginn der Verdünnung erstickten Normaltieren: 72,98% und bei den

Tabelle IV.

Tierart und Nr.	100 g *feuchte* Leber enthalten			100 g *Trockenleber* enthalten			Vom Gesamt-N sind			Vom Rest-N sind	
	Ges.-N g	Gesamt-Rest-N g	Rest-N II g	Ges.-N g	Rest-N g	Rest-N II g	Gesamt-Rest-N %	Pepton-N %	Harnstoff-, Amido- usw. N %	Pepton-N %	Ů-N %
Gestorbene Tiere.											
Ratte 15. Unter Luftverd. 89 Std.	3,209	0,532	0,239	11,4	1,95	0,88	16,58	9,13	7,45	48,1	51,9
„ 17. „ „ 84 „	3,223	0,685	0,380	12,3	2,68	1,45	21,24	9,44	11,80		
„ 18. „ „ 84 „	3,674	0,697	0,411	12,6	2,39	1,41	18,98	7,79	11,19		
„ 19. „ „ 60 „	3,272	0,722	0,342	11,9	2,61	1,23	22,06	11,61	10,45		
Überlebende Tiere.											
Ratte 12. Unter Luftverd. 72 Std.	4,077	0,665	0,415	12,3	2,00	1,28	16,32	6,13	10,19	31,8	68,2
„ 13. „ „ 120 „	3,559	0,525	0,359	11,6	1,71	1,14	14,76	4,84	9,92		
„ 14. „ „ 96 „	3,958	0,522	0,460	12,4	1,64	1,44	13,18	1,55	11,63		
„ 20. „ „ 84 „	3,464	0,531	0,307	11,0	1,68	0,97	15,33	6,46	8,87		
Operierte Tiere (Entfernung beider Schilddrüsen) nach Verdünnung.											
Ratte 21. Unt. Luftverd. 120 Std.	3,645	0,879	0,736	11,5	2,78	2,33	24,11	3,92	20,19	20,9	79,1
„ 22. „ „ 120 „	3,050	1,153	0,887	9,57	3,43	2,78	37,79	8,72	29,07		
„ 23. „ „ 120 „	2,178	0,782	0,613	7,11	2,55	2,00	35,91	7,78	28,13		
Operiertes Tier ohne Verdünnung (Schilddrüsenentfernung).											
Ratte 24	3,207	0,650	0,500	10,5	2,13	1,64	20,26	4,67	15,59	23,0	77,0
Hungertier (hungert 72 Stunden).											
Ratte 16	3,019	0,516	0,369	10,06	1,72	1,23	17,10	4,87	12,23	28,4	71,6
Normaltiere.											
Ratten 1, 3, 4, 8	3,558	0,403	0,213	13,18	1,50	0,8	11,32	5,33	5,99	47,1	52,9
Trächtige Tiere (ohne Luftverdünnung).											
Ratte 2	2,870	0,384	0,240	11,5	1,54	0,96	13,39	5,02	8,37	33,6	66,4
„ 7	3,347	0,466	0,326	12,25	1,71	1,20	13,93	4,18	9,75		
Mastfettlebern.											
Meerschwein 8	2,208	0,341	0,254	7,41	1,14	0,86	15,42	3,92	11,50	26,1	73,9
„ 9	2,687	0,607	0,488	9,0	2,04	1,64	22,59	4,43	18,16	20,0	80,0
Hungertier.											
Meerschwein 10	3,819	0,618	0,421	14,6	2,36	1,61	16,18	2,30	13,88	14,2	85,8

beiden trächtigen mit 73,84 %. Bei den *entbluteten* luftverdünnten Tieren jedoch beträgt er 68,19 %, fast ebensoviel bei den thyreoidektomierten und unter Verdünnung gehaltenen und dann entbluteten Tieren, nämlich 68,62 %. Etwas höher liegt er bei dem schilddrüsenlosen, nicht luftverdünnten Tiere mit 69,47 % und beträgt bei dem moribund getöteten Hungertier 70 %.

Danach hat wohl, auf welche Möglichkeit schon *Laubender* hinwies, die Todesart Einfluß auf den Wassergehalt der Organe post mortem, indem dieser bei den nicht entbluteten Tieren durch die in ihnen noch vorhandene Blutmenge höher gefunden wird als bei den durch Entblutung getöteten. Der hohe Wasser- und niedrige Trockenrückstandgehalt bei den nach längerer Verdünnung gestorbenen Tieren kann also nicht sicher als Wirkung der Verdünnung betrachtet werden. Angesichts des schwankenden Wassergehalts ist es notwendig, die weiteren Betrachtungen an die Zusammensetzung des Trockenrückstandes und nicht an die der frischen Organe anzuknüpfen.

B. Die *Trockensubstanz* der Leber zeigt nun durch die Luftverdünnung Veränderungen mehrfacher Art. Zunächst am

1. *Verhalten der stickstoffhaltigen Substanzen.* Diese wurden nur bei den Ratten verfolgt, da für das Meerschweinchen schon *Laubender* (a. a. O.) zahlenmäßige Beiträge beigebracht hat.

a) Die *Gesamtstickstoffwerte*, deren Einzelheiten aus der Haupttabelle zu entnehmen sind, liegen bei den luftverdünnten Ratten im Mittel bei *11,92 g* auf 100 g Trockensubstanz, und zwar betragen sie bei den am dritten bis vierten Tage nach begonnener Verdünnung *gestorbenen* Tieren (Nr. 15 bis 19) 12,05 g, bei den am Schluß *getöteten* (Nr. 12 bis 14 und 20) 11,82 g; dagegen bei den sogleich erstickten (Normal-) Tieren (Nr. 1, 3, 4, 8) 13,18 g. Bei den beiden trächtigen Tieren (Nr. 2 und 7) finden sich wiederum 11,85 g und bei dem moribund getöteten Hungertiere (Nr. 16) 10,06 g.

Hier zeigt sich also *bei den verdünnt gewesenen Tieren*, gleichgültig, ob sie während der Verdünnung starben oder zum Schluß durch Verbluten getötet wurden, *ein deutliches Minus an stickstoffhaltigen Stoffen* gegenüber den vier Normaltieren. Die beiden trächtigen Tiere zeigen dieselbe Minusdifferenz gegenüber den Normaltieren und eine noch größere das Hungertier, das auch in anderer Beziehung noch sich den luftverdünnten Tieren ähnlich verhält.

Bei den luftverdünnten *thyreoidektomierten* Tieren (Nr. 21 bis 23) liegt ein Wert mit 11,5 g auf der Höhe der nicht operierten verdünnten Tiere, *zwei Werte* dagegen sind *auffallend niedrig*: 9,57 und 7,11 g, so daß sich als Mittel für die schilddrüsenlosen Tiere 9,4 g ergeben würde — wenn man einen Mittelwert aus den stark differierenden

Einzelwerten ziehen darf —, gegenüber dem auch schon niedrigen Werte von 10,5 g bei der nicht luftverdünnten schilddrüsenlosen Ratte (Nr. 24). Wieweit die Entfernung der Schilddrüse auf die Menge und Beschaffenheit der Trockensubstanz von Einfluß ist, wird weiter untersucht werden. In *einer* Hinsicht scheint sie jedenfalls eine deutliche Wirkung zu haben, nämlich auf die *Zusammensetzung* der stickstoffhaltigen Substanzen der Leber.

b) Am Meerschweinchen hatte *Laubender* festgestellt, daß unter starken Luftverdünnungen der *Reststickstoff der Leber* mehr oder weniger erheblich ansteigt, und zwar von etwa 11% des Gesamtstickstoffs zu über 18%.

Dieser Anstieg der nicht eiweißartigen Stickstoffsubstanzen der Leber kommt aber nicht allein auf Kosten der Luftverdünnung, vielmehr spielt speziell die ungenügende bzw. aussetzende Ernährung eine wesentlich mitwirkende Rolle. *Laubender* hatte an 48 Stunden hungernden Meerschweinchen gefunden, daß deren Reststickstoff von den Normalwerten, das sind 10 bis 11% des Gesamtstickstoffs, bis gegen 15% steigen kann („*Hungerautolyse*“). Bei uns zeigt sich nun, daß bei einem 72 Stunden hungernden Meerschweinchen, das allerdings kurz ante mortem stand, der Rest-N auf 16% des gesamten steigen kann (Meerschweinchen 10).

Bei den *Ratten* liegt der *Normalwert* des Rest-N gleichfalls auf der bei anderen Tierarten gefundenen Höhe, nämlich bei *11,32*%. Er ist auf 17,1% gestiegen bei einer nach 72stündigem Hunger moribund gefundenen und getöteten Ratte. Dieser Wert ist durch den Allgemeinzustand des Tieres wohl abnorm in die Höhe getrieben. Bei den unter Luftverdünnung *gestorbenen* Tieren, die — außer Tier 15 — nicht hungerten, ist der Rest-N aber noch weiter gesteigert, bis zu *22*% des gesamten N, das ist eine Steigerung um 100%, und er beträgt im Mittel bei diesen Tieren *19,7*%, entsprechend 74% Zunahme gegen den gefundenen Normalwert.

Niedriger als bei dem moribunden Hungertier ist der Anteil des Reststickstoffs bei denjenigen Tieren, die bis zum Schluß der Luftverdünnung lebten. Laut den mitgeteilten Protokollen hatten diese sich aber akklimatisiert und waren trotz längeren Hungerns munter. Tier 20 wurde übrigens erst 15½ Stunden nach Schluß der Verdünnungsperiode entblutet.

Daß die Luftverdünnung als solche Einfluß auf den N-Bestand der Leber hat, unabhängig vom Ernährungszustand, ergibt sich daraus, daß die durch die Luftverdünnung gestorbenen, aber während der Versuchszeit Futter nehmenden Tiere 17 bis 20 (vgl. Bemerkungen zu Tabelle II) einen Rest-N von im Mittel *20,76*% hatten, die Tiere 12

bis 14 jedoch, die überlebten und keine oder wenig Zeichen von Sauerstoffmangel zeigten, *trotz Hungers* nur im Mittel 14,75 % Reststickstoff aufwiesen.

Einen auffallenden Befund bieten wieder die *thyreoidektomierten* Tiere. Schon bei dem nicht der Luftverdünnung ausgesetzten Tiere steigt der Rest-N der Leber auf 20,26 %, um bei den verdünnten in maximo auf 37,8 %, im Mittel auf 32,8 % sich zu erheben, Werte, wie sie meines Wissens außer bei manchen Vergiftungen nie beobachtet worden sind. Diese Wirkung der Schilddrüse auf den Eiweißbestand der Leber war bisher nicht bekannt und soll weiter verfolgt werden.

Endlich zeigen auch die beiden *trächtigen* Ratten eine Steigerung des Rest-N, die bei der Nr. 2 sicher *nicht* auf die Luftverdünnung zurückzuführen ist — sie starb schon 6 Minuten nach Beginn der Verdünnung —, wohl auch nicht bei Ratte 7, die nur 1 Stunde unter Verdünnung war.

c) Der *Reststickstoff* wurde durch Fällung mit Uranylacetat in zwei Fraktionen geteilt, deren eine die höheren Spaltprodukte des Eiweißes, wie Peptone, enthält, deren andere die tiefer abgebauten Anteile: Aminosäuren, Harnstoff und ähnliches.

Beim Meerschweinchen hatte *Laubender* gefunden, daß durch *Luftverdünnung* die letztere Fraktion (F. II) stärker vermehrt wird als die erstere, während bei seinem *Hunger*meerschweinchen die Peptonfraktion ungefähr in gleichem Maße wie die Harnstofffraktion gesteigert war. In unseren Rattenversuchen sind die Ergebnisse etwas andere als die bei Meerschweinchen gefundenen. Nach Tabelle IV verteilt sich bei den *normalen* Ratten (Nr. 1, 3, 4, 8) der Rest-N fast gleich auf Pepton- und Harnstofffraktion, wobei letztere etwas überwiegt (47,2 : 52,9 %).

Das Überwiegen des Harnstoff-N findet sich nun bei den Ratten in *allen* Fällen mit Ausnahme von zwei in Verdünnung gestorbenen Tieren (Nr. 15 und 19). Er übersteigt die normalen Verhältniswerte schon bei den trächtigen Ratten mit 66,4 gegen 33,6 % Pepton-N. Er findet sich besonders bei dem 72 Stunden ohne Nahrung gehaltenen in extremis befindlichen Tiere ausgesprochen (Tier 16). Bei diesem ist U^+-N zu Pepton-N wie 71,6 : 28,4 %. Aber auch bei unserem Hunger*meerschweinchen* ist das Verhältnis von U^+-N zu Pepton-N wie 85,8 : 14,2 %, so daß ein prinzipieller Unterschied zwischen Ratte und Meerschweinchen nicht bestehen dürfte, und die niedrigen U^+-N-Werte, die *Laubender* fand, auf die kürzere Hungerzeit zurückzuführen sind.

Bei den übrigen Versuchstieren ist das Verhältnis der beiden Rest-N-Fraktionen zueinander wechselnd. Gerade bei den unter Verdünnung *gestorbenen* Ratten verhalten sie sich wie bei den Normaltieren, im Mittel 48,1 Pepton-N zu 51,9 Harnstoff-N. Bei den die

Luftverdünnung *überlebenden* Ratten ist dagegen Pepton-N zu Harnstoff-N wie 31,8 zu 68,2%, wobei sich bei Tier 14 der extreme Wert von 11,8 : 88,2 findet.

Auffallend sind wiederum die Werte bei den *schilddrüsenlosen* Tieren. Schon die unter Normaldruck (630 mm) gehaltene Ratte (Nr. 24) zeigt den abnorm hohen Wert von 77% U^{+}-N gegen 23% Pepton-N, und noch schärfer stellt sich der Unterschied bei den drei unter Verdünnung gehaltenen, bei denen U^{+}-N zu Pepton-N sich im Mittel wie 79,1 : 20,9% (Maximum des Pepton-N 23,1%, Minimum 15,8%) verhalten.

Dabei sei nochmals betont, daß gerade die thyreoidektomierten Tiere, wie aus Untersuchungen der *Asher*schen Schule bekannt ist, die Luftverdünnung besser ertragen als die Normaltiere, daß sie auch in unseren Versuchen sich besser verhielten als die nicht operierten Tiere und auch während der Verdünnungsperiode Nahrung aufnahmen.

Was unter den vorstehenden Befunden bisher unbekannt war und weiterer Klärung bedarf, ist die Wirkung der Schilddrüsenentfernung auf den Rest-N der Gewebe (Leber), sowohl was seine Höhe, wie seine Zusammensetzung betrifft. Was den bisherigen Anschauungen widerspricht, ist die im Vergleich mit dem Peptonstickstoff geringe Zunahme des Harnstoff-Stickstoffs bei den unter Verdünnung gestorbenen Ratten.

2. *Die ätherlöslichen Bestandteile der Leber.* a) Histologisch hatte *Rosin* (a. a. O.) gefunden, daß zwischen Meerschweinchen und Mäusen Unterschiede bestehen, indem erstere mehr oder weniger hochgradige Verfettungen nach Luftverdünnung in der Leber aufweisen, neben anderen Degenerationen des Protoplasmas bei einzelnen Tieren, letztere dagegen nur geringe Fettansammlungen in einzelnen Leberzellen bei einigen Tieren erkennen ließen. Die gleichen Fettansammlungen waren jedoch bei den Kontrollmäusen ebenso vorhanden. Dieselben Unterschiede finden sich auch in unseren Versuchen. Die Meerschweinchen zeigen auch hier mehr oder weniger hochgradige Verfettungen der Leber, daneben wiederum anderweitige Degenerationen, die Ratten dagegen ließen nur in *einem* Falle stärkere zentrale Verfettung der Leberläppchen erkennen.

Es ist bekannt, daß der *chemische* Befund von Fettablagerung mit dem histologischen nicht parallel geht, daß man auf ersterem Wege größere Mengen von Fett ermitteln kann, während histologisch kein oder wenig Fett festzustellen ist. Dieses Verhalten zeigt sich auch bei uns, wie ein Vergleich der Protokollangaben mit den Werten der Haupttabelle am Schluß der Arbeit ergibt. Nur insofern sagen histologische und chemische Befunde das gleiche aus, als, entsprechend letzteren auch erstere in den Lebern der luftverdünnten Meerschweinchen mehr Fett zeigten als bei den Ratten.

Bei den *Meerschweinchen nimmt während der Luftverdünnung die Menge an Ätherextrakt zu,* und wenn auch nicht regelmäßig, so doch deutlich mit deren Dauer.

Auf feuchte Substanz bezogen, steigt sie (vgl. Haupttabelle) von 4,63 bzw. 5,8% bei 24- bzw. 12stündiger Verdünnung auf 8,04% bei einer von 108 Stunden. Berechnet auf *Trocken*substanz enthalten die Lebern der *Mast*tiere (Nr. 8 und 9) nur 5,9 und 9,18% Ätherextrakt, dafür reichlich Glykogen. Das *Hunger*meerschweinchen hat demgegenüber wenig Glykogen und 15,74% Fett. Die unter *Luftverdünnung* gehaltenen Tiere enthalten noch wesentlich mehr, auch wo die Luftverdünnung weniger lange dauerte als beim Hungertiere die fast zum Tode führende Hungerperiode. Bei den luftverdünnten Tieren ist der niedrigste Ätherextraktwert 16,42, der höchste bei dem am längsten im Verdünnungsversuch gehaltenen Tiere 28,82 auf 100 Trockensubstanz. Diese Zahlen lassen schließen, daß während der Luftverdünnung eine Fettanhäufung in der Leber stattgefunden hat, wobei es unentschieden bleibt und zunächst auch ohne Bedeutung, ob eine Zuwanderung von Fett oder eine Umwandlung anderer Leberbestandteile in solche stattgefunden hat.

Bei den meisten *Ratten* liegen die Fettwerte niedriger; nur bei dreien von elf überschreiten sie den *niedrigsten* bei den unter Luftverdünnung gehaltenen Meerschweinchen gefundenen Wert und in nicht wenigen Versuchen mit Verdünnung übersteigen sie nur wenig den an den normalen Ratten gefundenen. Ein Unterschied zwischen den die Verdünnung überlebenden und den während der Verdünnung gestorbenen Tieren ist nicht deutlich. Bemerkenswert ist, daß alle drei *thyreoidektomierten* Tiere sehr niedrige Ätherextraktwerte aufweisen, zwei von ihnen die niedrigsten überhaupt gefundenen; Werte, die gleich sind den der Kontrolltiere, und daß alle drei unter dem Wert des ohne Verdünnung gehaltenen thyreoidektomierten Geschwistertieres liegen. Histologisch war bei ihnen kein Fett festzustellen. Man kann diesen Wirkungsmangel der Luftverdünnung nicht darauf beziehen, daß die schilddrüsenlosen Tiere die Luftverdünnung besser ertragen hätten als die nicht operierten, und so von der Verdünnung unberührt geblieben wären, denn dagegen spricht das vorher (S. 305) mitgeteilte Verhalten der Reststickstoffwerte. Auch bei der *verhungerten* Ratte ist der Fettgehalt der Leber weit niedriger als bei dem verhungerten Meerschweinchen.

Aus allem muß man schließen, daß *Ratten* — ebenso wie Mäuse — *auf Luftverdünnung weniger mit Verfettungsvorgängen reagieren* als Meerschweinchen und, wie wir fanden, als Kaninchen, was auch dem histologischen Befunde entspricht. Immerhin kann es auch bei Ratten zu Fettansammlungen kommen.

b) Bisher wurde meist — im medizinisch-klinischen Sinne — von Fett und Fettanhäufung gesprochen, an Stelle der chemisch richtigeren Bezeichnung: Ätherextraktstoffe. Es war nach allen Erfahrungen anzunehmen, daß es sich nicht um Fette im chemischen Sinne handelte, vielmehr um *lipoide* Stoffe. Das sollte durch die Phosphorbestimmung des Ätherextrakts ermittelt werden. Es ergab sich dabei nicht nur, daß der Ätherextrakt Lipoide enthält (Haupttabelle und Tabelle V), sondern daß die *Luftverdünnung einen Einfluß auf Verteilung und Art der Leberlipoide ausüben kann.* Auch in dieser Beziehung bestehen wieder Unterschiede zwischen Meerschweinchen und Ratten.

Zunächst die *Gesamtphosphormenge.* Bei dem sehr verschiedenen Gewicht der Lebern können die gewonnenen Werte nicht unmittelbar miteinander verglichen werden, vielmehr geben nur die auf die gleiche Menge feuchter oder besser trockener Substanz bezogenen Werte Aufschluß (vgl. Haupttabelle, Reihe 24).

Bei den *Meerschweinchen* liegen die Phosphorwerte bei allen luftverdünnten Tieren fast auf gleicher Höhe (eine Ausnahme macht nur Tier 3) und betragen nur etwas weniger als das Mittel der beiden Masttiere. Der Mittelwert bei den luftverdünnten Tieren (ohne Nr. 3) ist 1,253 % der Trockensubstanz, der der Masttiere 1,414 %. Nur das Hungertier zeigt den erheblichen höheren Wert von 2,23 % P. *Eine Zunahme des Gesamtphosphors mit der Luftverdünnung ist also nicht zu erkennen.* Dabei tritt aber eine deutliche *Verschiebung* zwischen dem im Ätherextrakt und dem in der ätherextrahierten Lebersubstanz enthaltenen Phosphor ein. *Der mit Äther extrahierbare Phosphor nimmt unter Luftverdünnung deutlich zu,* der im Rückstand enthaltene dagegen ab. Die Zunahme geht im Ätherextrakt von 0,89 bis 0,94 % bei den beiden nur 12 bis 24 Stunden luftverdünnten Tieren über 1,5 bis auf 3,55 %, wenn auch der Anstieg nicht durchaus parallel der Verdünnungszeit vor sich geht. Demgegenüber nimmt (wieder mit Ausnahme von Tier 3) der P-Gehalt des ausgeätherten Rückstandes von 1,4 über 1,05 bis auf 0,78 % ab. Die Phosphorwerte im Ätherrückstande liegen bei den längere Zeit verdünnten Tieren niedriger als bei den Masttieren (1,03 bis 1,1 %) und bei dem Hungertiere (1,84 %).

Kann man schon aus diesem Verlauf schließen, daß unter der Luftverdünnung ein Teil des in der Norm nicht ätherlöslich gewesenen Phosphors im Äther löslich wurde, so tritt die Verschiebung klarer und zahlenmäßig eindrucksvoller hervor, wenn man, wie auf Tabelle V durchgeführt, den P-Anteil berechnet, der vom gesamten Phosphorgehalt der Leber sich im Ätherextrakt findet, und weiter feststellt, wie sich die P-Menge in 100 Ätherextrakt zu der in 100 Rückstand stellt.

Tabelle V.

Meerschweinchen			Ratten		
Tier Nr.	Verteilung des P auf Ätherextrakt und Rückstand: a) Vom Ges.-P enthält der Ätherextrakt %	b) 100 Ätherextrakt und 100 Rückstand enthalten P wie	Tier Nr.	Verteilung des P auf Ätherextrakt und Rückstand: a) Vom Ges.-P enthält der Ätherextrakt %	b) 100 Ätherextrakt und 100 Rückstand enthalten P wie
2 (verdünnt)	13,80	100 : 149	1, 3, 4, 8 normal	36,0	100 : 21,4
3 (verdünnt)	25,62	100 : 84,7	2 (trächtig)	41,7	100 : 28,3
			7 (trächtig)	33,4	100 : 27,6
4 (verdünnt)	27,70	100 : 70,1	15 (in Verdünnung gestorben)	57,4	100 : 13,1
5 (verdünnt)	41,2	100 : 33,0	17 (in Verdünnung gestorben)	36,2	100 : 21,8
6 (verdünnt)	47,0	100 : 22,2	18 (in Verdünnung gestorben)	[12,5	100 : 90,8]
7 (verdünnt)	48,7	100 : 42,5	19 (in Verdünnung gestorben)	42,2	100 : 28,2
8 (Masttiere)	12,2	100 : 50,0	12 (Verdünnung überleb.)	29,0	100 : 52,1
9 (Masttiere)	41,6	100 : 139	13 (Verdünnung überleb.)	33,0	100 : 33,6
			14 (Verdünnung überleb.)	38,0	100 : 35,0
10 Hungertier	30,5	100 : 42,5	20 (Verdünnung überleb.)	49,4	100 : 15,6
			16 Hungertier	62,8	100 : 10,3
			21 (thyreoidektom. verdünnt)	51,3	100 : 11,4
			22 (thyreoidektom. verdünnt)	32,25	100 : 24,2
			23 (thyreoidektom. verdünnt)	14,05	100 : 52,8
			24 thyreoidektomiert	44,2	100 : 21,5

Dabei ergibt sich, daß bei den bis zu 36 Stunden unter Verdünnung gehaltenen *Meerschweinchen* im Ätherextrakt 13,8 bis 27,7 % des gesamten Leberphosphors vorhanden sind, bei den länger verdünnten steigt sein Anteil bis zu 48,7 %, d. h. fast bis zur Hälfte des gesamten Leberphosphors. Diese letzteren Werte liegen noch weit über dem des Hungertieres mit 30,5 % und auch über dem der trächtigen, deren eines allerdings 41,6 % Ätherextrakt-P zeigt.

Betrachtet man die Phosphor*konzentration* im Extrakt und im Rückstand, so zeigt sich ein gleicher Gang. Bei den drei für *kürzere* Zeit luftverdünnten Meerschweinchen überwiegt (Tier 2) der P im Rückstand oder er geht verhältnismäßig wenig unter den im Extrakt hinunter (Tier 3), bei den *längere* Zeit verdünnten jedoch geht er bis auf weniger als ein Viertel des P-Gehalts im Extrakt hinab. *Der Extrakt reichert sich also immer mehr an Phosphor an.*

Anders liegen die Dinge bei den *Ratten*. Auffallend ist schon (s. Haupttabelle), um wieviel höher der P-Gehalt der Leber im ganzen bei ihnen gelegen ist. Auf 100 g Trockenleber kommen bei den Normaltieren 1,76 g P, bei den trächtigen 2,3 bis 2,5 g, bei den unter der Luftverdünnung gestorbenen finden sich 1,83 bis zu 3 g P, im Mittel 2,8 g, bei den überlebenden 1,97 bis 4,18, im Mittel 2,9 g.

Bei dem thyreoidektomierten Tier (Nr. 24) beträgt der Gesamt-P 3,45% der Trockensubstanz. Bei den nach Schilddrüsenentfernung luftverdünnten Tieren (Nr. 21 bis 23) 1,57 bis 5,07, im Mittel 3,11%; bei der *Hunger*ratte zeigt sich mit 7,93% der höchste Wert. Die Hungerratte zeigt also in bezug auf den P-Gehalt der Leber dasselbe wie das Hungermeerschweinchen.

Was die *Wirkung der Luftverdünnung* betrifft, so ist es aus dem vorliegenden Material schwer, einen eindeutigen Schluß zu ziehen. Dazu schwanken die Werte zu sehr. Man kann aber doch sagen, daß bei einer Reihe von der Luftverdünnung ausgesetzten Tieren der *P-Gehalt der Leber den der Normaltiere zum Teil sehr beträchtlich übertrifft*, und daß jedenfalls die fast vollkommene Konstanz, die bei den Meerschweinchen vorhanden ist, nicht gewahrt bleibt. Die P-Zunahme betrifft dabei meist Ätherextrakt und *Ätherrückstand*, letzteren oft noch erheblicher als ersteren. Es drängt sich die Annahme auf, daß hier prinzipiell verschiedene biologische Vorgänge im Spiele sind, sie braucht aber bei dem zu ihrer Begründung fehlenden Beweismaterial zunächst nicht erörtert zu werden.

Auch in der *Verteilung* des Phosphors auf Extrakt und Rückstand und in dem Gehalt beider an Phosphor unterscheiden sich Ratten und Meerschweinchen. Die Tabelle V zeigt zunächst, daß schon bei den *normalen* Ratten der Ätherextrakt der Leber einen weit höheren Anteil am Gesamt-P-Gehalt hat als bei den Meerschweinchen, und daß auch die unter Verdünnung gefundenen Maximalwerte höher liegen als bei diesen. Zwei ganz unwahrscheinliche, wohl durch Versuchsfehler bedingte Werte fallen aus der Reihe.

Ebenso übertrifft der P-Wert im Ätherextrakt bei der Hungerratte beträchtlich den beim Hungermeerschweinchen. Aber das, was beim Meerschweinchen deutlich ist, die fortschreitende Zunahme des Phosphors im Ätherextrakt mit der Dauer der Luftverdünnung läßt sich bei den Ratten *nicht* erkennen, wobei auch die thyreoidektomierten keine Ausnahme machen. Ein nicht geringer Teil liegt nur auf der Höhe der Normalwerte.

Dasselbe ergibt sich bei Betrachtung der *P-Konzentration* im Ätherextrakt einerseits, im Rückstand andererseits. So hohe Werte für den Phosphor im *Rückstand* wie bei den normalen oder den kürzere Zeit luftverdünnten Meerschweinchen finden sich bei den Ratten überhaupt nicht. Alle, auch schon die normalen Werte, entsprechen mit zwei Ausnahmen (der Wert von Nr. 18 bleibt außer Betracht) den niedrigsten bei den Meerschweinchen unter längerer Luftverdünnung gefundenen Werten. Dafür aber *fehlt* auch hier *die eindeutige Wirkung der Luftverdünnung auf die P-Verteilung* zwischen Ätherextrakt und Rückstand im Sinne einer P-*Zu*nahme im Extrakt, einer *Ab*nahme

im Rückstande, im Gegensatz zu den Meerschweinchen, bei denen dies deutlich hervortritt. Bei den Ratten wird vielmehr die Phosphormenge unter Luftverdünnung im Äther*rückstande* häufiger vermehrt gefunden als im Ätherextrakt. Welche Umstände es sind, die zu den Eigentümlichkeiten der P-Verteilung auf Extrakt und Rückstand bei den beiden Tierarten führen, welche verschiedenen Bindungsverhältnisse hier vorliegen, läßt sich zunächst nicht sagen; jedenfalls verdient der Befund als solcher wohl schon Interesse.

c) Der ätherlösliche Phosphor wird als Maßstab für die Menge der vorhandenen Lipoide genommen, man bezieht ihn auf diese und berechnet sie aus ihm, wobei bei der Unsicherheit über die Natur der einzelnen Lipoide der Phosphor gewöhnlich als dem *Lecithin* zugehörig angenommen und in Lecithin umgerechnet wird.

Tut man dies auch in unseren Versuchen, so ergeben sich die Werte der Tabelle VIa und VIb. Die Lecithinwerte sind auf 100 Ätherextrakt berechnet. Ihr Verlauf sagt bei Vergleich der einzelnen Versuche miteinander zunächst dasselbe wie das Verhalten des Phosphors im Ätherextrakt auf Tabelle Va. Wie dieser muß natürlich auch die Lecithinmenge bei Meerschweinchen und Ratten sich verschieden darstellen. Aber bei den *Meerschweinchen* bleiben, mit Ausnahme des Hungertieres und des einen Masttieres, die Lecithinmengen innerhalb der Mengen des Ätherextrakts; auch die höchste Lecithinmenge beträgt nur 91 % desselben. Bei dem Hungertiere allerdings würden sich 112 Lecithin auf 100 Ätherextrakt berechnen, bei dem Masttier Nr. 9 auf 191 %.

Tabelle VIa. Meerschweinchen.
Gesamtätherextrakt: Lecithin = 100:

Tier:	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Verdünng.:	24 Std.	12 Std.	36 Std	60 Std.	48 Std.	108 Std.	—	—	—
—	24,2	23,0	34,0	70,0	91,0	57,0	63,0	191	112

Tier 2 bis 7: luftverdünnt. Tier 8 und 9: Masttiere. Tier 10: Hungertier.

Tabelle VIb. Ratten.
Gesamtätherextrakt: Lecithin = 100:

Tier 1, 3, 4, 8	2	7	12	13	14	15	16
—	—	—	72 Std.	120 Std.	96 Std.	95 Std.	72 Std.
152	114	173	84	155	232	276	914

Tier 17	18	19	20	21	22	23	24
84 Std.	84 Std.	60 Std.	84 Std.	120 Std.	120 Std.	120 Std.	—
190	113	117	290	195	216	148	280

Tier 1, 3, 4, 8: normal. Tier 2, 7: trächtig. Tier 12 bis 20: luftverdünnt. Tier 21 bis 23: luftverdünnt nach Thyreoidektomie. Tier 24: thyreoidektomiert.

Ganz anders stellen sich aber die Ergebnisse bei den *Ratten*. Schon bei den Normaltieren haben wir 52 % mehr Lecithin, als dem Ätherextrakt entspricht, und bei keinem einzigen Tier — außer Nr. 12, mit 84 % Lecithin — liegt der berechnete Lecithinwert innerhalb der Grenzen des Ätherextrakts, er übertrifft es häufig um das Mehrfache[1]).

Es ist klar, daß *bei den Ratten die Berechnung des Phosphors auf Lecithin unmöglich* ist. Es muß sich hier entweder um anders gebaute organische, phosphorhaltige und ätherlösliche Stoffe handeln, oder um ein Gemisch von organischen Lipoiden, in dem auch Lecithin sein könnte, mit einfachen anorganischen, unter den gegebenen Verhältnissen in Äther übergehenden Phosphorverbindungen.

Die Erfahrungen an den Ratten machen es aber zweifelhaft, ob man berechtigt ist, bei den Meerschweinchen, bei denen mit Rücksicht auf die Mengenverhältnisse des Phosphors im Ätherextrakte seine Umrechnung auf Lecithin zu keinen unannehmbaren Werten führt, diese Berechnung vorzunehmen, und ob nicht auch bei diesen ähnliche Verhältnisse wie bei den Ratten vorliegen, d. h. der Phosphor des Ätherextrakts nicht dem Lecithin allein zukommt. Das Gesagte gilt auch für alle in der Literatur vorliegenden Lecithinberechnungen aus dem Phosphor, zunächst mindestens für pathologische Verhältnisse, z. B. für den häufig untersuchten Ätherextrakt der Leber phosphorvergifteter Tiere.

Bei sieben Meerschweinchen sind neben den Extraktionen mit Äther auch solche mit Alkohol vorgenommen worden. Die dabei gewonnenen Extraktmengen sind, wie zu erwarten war, größer als die Mengen des Ätherextrakts. Ebenso ist der Phosphorgehalt des Alkoholextrakts festgestellt worden. Das gewonnene Material ist zu klein, um etwas Abschließendes auszusagen. Nur eine Übersicht über das *Verhältnis* der Äther- und Alkoholextraktmengen sei hier gegeben, da es die Grundlage für weitere Untersuchungen abgeben kann.

Tabelle VII.

Die Ätherextraktmenge verhält sich zur Alkoholextraktmenge

bei	Meerschweinchen	4	wie	100 : 155.	Unter	Verdünnung	36	Stunden
„	„	5	„	100 : 175.	„	„	60	„
„	„	6	„	100 : 215.	„	„	48	„
„	„	7	„	100 : 123.	„	„	108	„
„	„	8	„	100 : 545	gefüttert			
„	„	9	„	100 : 302	gefüttert			
„	„	10	„	100 : 142	Hungertier			

Nach den Werten der Tabelle VII übertrifft bei dem an längsten unter Luftverdünnung gehaltenen Tiere 7 die Alkoholextraktmenge die des

[1]) Für die Phosphorvergiftung hatte *Carbone* (Arch. ital. de biol. **26**, 279, 1896) bei Hunden gefunden, daß der Lecithingehalt mehr betragen könne als der Ätherextrakt.

Tabelle VIII. Verhältnis von N : P in der Leber.

Tierart	Es enthalten 100 g feuchter Leber N g	feuchter Leber P g	feuchter Leber P in % von N	trockener Leber N g	trockener Leber P g	trockener Leber P in % von N	Bemerkungen	Tierart	Es enthalten 100 g feuchter Leber N g	feuchter Leber P g	feuchter Leber P in % von N	trockener Leber N g	trockener Leber P g	trockener Leber P in % von N	Bemerkungen
Meerschwein 8	2,208	0,355	16	7,41	1,192	16,1	Mastfettleber	Ratte 1, 3, 4, 8	3,558	0,475	13	13,18	1,758	13,3	Normaltier
9	2,687	0,466	17	9,0	1,647	18,2	"	12	4,077	0,653	16	12,3	1,969	16,5	In Luftverdünnung 72 Stunden
10	3,819	0,582	15	14,6	2,231	15,3	Nach einigen Hungertagen	13	3,559	0,759	21	11,6	2,461	21,2	" " 120 "
								14	3,958	1,329	33	12,4	4,18	33,6	" " 96 "
								20	3,464	0,944	28	11,0	2,987	27,1	" " 84 "
								15	3,209	1,027	32	11,4	2,80	24,5	In der verd. Luft gestorben nach 95 Stunden
								17	3,223	0,663	28	12,3	2,527	20,5	In der verd. Luft gestorben nach 84 Stunden
								18	3,674	1,174	32	12,6	4,029	32,0	Dasselbe
								19	3,272	0,505	18	11,9	1,83	15,4	In der verd. Luft gestorben nach 60 Stunden
								21	3,645	0,496	14	11,5	1,571	13,6	Nach Entfernung der Schilddrüsen in Luftverd. 120 Std. (21–23)
								22	3,050	0,855	28	9,57	2,69	28,1	
								23	2,178	1,547	27	7,11	5,058	71,0	
								24	3,207	1,053	33	10,5	3,449	32,8	48 Std. nach Entfernung der Schilddrüse
								16	3,019	2,380	78	10,06	7,93	79,3	Nach 72 Std. Hunger; moribund
								2	2,87	0,575	20	11,5	2,295	20	Trächtige Tiere (2, 7)
								7	3,347	0,689	20	12,25	2,529	20,6	

Ätherextrakts um 23%, bei dem 16 Stunden verdünnten um 73%, bei dem 48 Stunden verdünnten um mehr als das Doppelte; um 55% bei dem 36 Stunden im Versuch gewesenen. Das Hungertier zeigt ein Plus von 42% für den Alkoholextrakt.

Außerhalb dieser Werte liegen die für die gefütterten Meerschweinchen mit der 3- und 5½fachen Menge an Alkoholextrakt, gegenüber der durch Äther extrahierten.

d) Schließlich sei aus den gewonnenen *Stickstoff- und Phosphorwerten* noch das *Verhältnis*, in dem beide unter den verschiedenen Versuchsbedingungen zueinander stehen, berechnet. Hierüber liegen mehrfache Bestimmungen an verschiedenen Tierarten vor: am Hunde, an Kaninchen, an Hühnern. Stets fand sich bei Hund und Huhn ein Wert von 10 bis 12% P auf 100 N, gleichgültig, ob die Tiere gefüttert waren oder gehungert hatten. Beim Kaninchen sind 16% Phosphor im Verhältnis zum Stickstoff ermittelt worden. Die gleichen Werte wie an letzterem ergeben sich bei uns für das Meerschweinchen. Die normalen Ratten haben einen wenig niedrigeren Wert von 13% P.

Demgegenüber *nimmt die prozentische Phosphormenge unter Luftverdünnung zu*, wie die Zahlen auf Tabelle VIII zeigen.

Bei den überlebenden Ratten (Nr. 12 bis 14 und 20) beträgt ihr Verhältniswert zum Stickstoff zwischen 16 und 33%, im Mittel 24,5%, bei den unter Luftverdünnung gestorbenen 18 bis 32%, im Mittel 27,5% auf feuchte Leber bezogen, und 15 bis 33%, im Mittel 23,1% auf Lebertrockensubstanz. Diese Werte entsprechen denen, die *Wohlgemuth* mit 24,4% an der Leber phosphorvergifteter Kaninchen festgestellt hat.

Auffallend hoch liegt der prozentische P-Gehalt auch bei der schilddrüsenlosen Ratte (Nr. 24), mit 33%, abnorm hoch bei der moribunden Hungerratte mit 79%. Allein bei den nach Schilddrüsenentfernung unter Verdünnung gehaltenen Ratten zeigen sich beträchtliche Schwankungen, die weitere Bestimmungen notwendig machen.

Auch bei den beiden *trächtigen* Tieren liegt die Phosphormenge mit 20% der Stickstoffmenge höher als normal.

Die Luftdruckerniedrigung, die hier in erster Linie interessiert, führt danach zu einer *Anreicherung des Phosphors im Verhältnis zum Stickstoff*, die nicht durch eine Abnahme des Stickstoffs, sondern durch ein Steigen des Phosphors zustande kommt.

V. Zusammenfassung.

Die Wirkungen der Luftverdünnung, die an Meerschweinchen und an normalen sowie thyreoidektomierten Ratten untersucht wurden,



wurden bei beiden Tierarten nicht gleich gefunden. Die Untersuchungen erstreckten sich auf die Gewichtsabnahme, auf Körpertemperatur und auf das chemische Verhalten der Leber.

Im einzelnen fand sich, daß bei den benutzten starken Verdünnungen, entsprechend im Mittel 250 mm Barometerdruck = etwa 8500 m Höhe, die Gewichtsabnahmen bei den Meerschweinchen ceteris paribus (Hunger) weit stärker waren als bei den Kontrolltieren. Bei den Hungerratten war gleichfalls die Gewichtsabnahme unter Verdünnung gesteigert, wenn auch weniger ausgesprochen als bei den Meerschweinchen. Die stärkere Gewichtsabnahme unter Luftverdünnung ist besonders darum auffallend, weil dabei die Körpertemperatur mehr oder weniger erheblich unter die Norm sank, was bei normalem Stoffwechsel zu einer Einschränkung des Zerfalls und einer *verminderten* Gewichtsabnahme führen sollte.

Auf den *Wassergehalt* der Leber war ein Einfluß nicht sicher festzustellen, wenn die Todesart in Betracht gezogen wurde. Die entbluteten Ratten hatten einen geringeren Wassergehalt als die ohne Blutverlust zugrunde gegangenen, ohne Rücksicht auf den Aufenthalt unter Luftverdünnung.

Bei den unter Luftverdünnung gewesenen Ratten lag der *Gehalt an stickstoffhaltigen Substanzen* in der Leber niedriger als bei den Normaltieren. Ebenso zeigten die Hungerratte und auch die beiden trächtigen niedrigere Stickstoffwerte als die Normaltiere. Ganz besonders niedrig lag der Stickstoffgehalt bei zwei von drei nach Thyreoidektomie luftverdünnt gewesenen Ratten.

Aber nicht nur die Menge, sondern auch die *Beschaffenheit* der stickstoffhaltigen Stoffe war gegenüber der Norm verändert, indem – ebenso wie es *Laubender* bei Meerschweinchen gefunden hatte, aber infolge der stärkeren Verdünnung und längeren Ausdehnung der Versuche in höherem Maße — der *Reststickstoffanteil am Gesamtstickstoff abnorm gesteigert* war. Er war mehr erhöht als durch den Hunger allein. der an sich schon zu einer Steigerung des Reststickstoffs führt. In maximo betrug bei den unter Luftverdünnung gestorbenen Tieren die Rest-N-Steigerung 100%, im Mittel 74%. Einen besonderen Einfluß scheint auf die Menge des Reststickstoffs die *Schilddrüse* auszuüben; das schilddrüsenlose Tier zeigte eine Rest-N-Steigerung um 80% gegenüber den Normalwerten, die verdünnten schilddrüsenlosen Tiere in maximo + 234%, im Mittel + 190%. Auch die *trächtigen* Ratten zeigten erhöhte Rest-N-Werte. Fast ausnahmslos ist es die Harnstofffraktion, die überwiegend gesteigert ist, mehr als die Peptonfraktion. Das tritt auch bei den schilddrüsenlosen Tieren hervor, und zwar auch ohne Luftverdünnung.

Deutliche Besonderheiten zeigt *der Ätherextrakt.* Bei den unter Luftverdünnung gehaltenen *Meerschweinchen* läßt sich eine mehr oder weniger starke Zunahme desselben gegenüber dem gleichgehaltenen Hungertier und mehr noch gegenüber den gefütterten erkennen. Diese Zunahme der Verfettung ist bei den Ratten viel weniger ausgesprochen. Bei den luftverdünnten Ratten liegt die Menge des Ätherextrakts im allgemeinen niedriger als bei den Meerschweinchen, besonders gering ist sie bei den schilddrüsenlosen Tieren.

Der Ätherextrakt ist *phosphorhaltig*, enthält also nach der gewöhnlichen Auffassung Lipoide. Bei den *Meerschweinchen* nehmen diese im Ätherextrakt, gemessen am Phosphorgehalt desselben, unter Luftverdünnung zu, während der P-Gehalt im Ätherrückstand abnimmt. Die phosphorhaltigen Bestandteile der Leber werden also fortschreitend ätherlöslicher. Dabei nimmt der *Gesamt*-P-Gehalt der Leber bei den Meerschweinchen *nicht* deutlich zu. Bei den *Ratten*, bei denen der Phosphorgehalt der Leber an sich höher liegt als bei den Meerschweinchen, steigt bei einem Teil der Tiere die Gesamt-P-Menge unter Luftverdünnung. Dagegen nimmt der P-Gehalt im Äther*extrakt* nicht deutlich zu und nimmt im Ätherrückstande nicht ab, zeigt vielmehr auch in ihm eine Zunahme. Beides im Gegensatz zu den Meerschweinchen. Der P-Gehalt des Ätherextrakts der Ratten ist so beträchtlich, daß eine Berechnung auf Lecithin unmöglich ist, da dessen Menge zum Teil um das Mehrfache die des Ätherextrakts übersteigen würde.

Das *Verhältnis von P zu N* in der Leber steigt unter Luftverdünnung bei den Ratten weit über die Norm; auch bei den schilddrüsenlosen und den trächtigen Ratten ist es über den Wert bei den normalen Tieren erhöht. Es erfolgt eine Anreicherung von Phosphor im Verhältnis zum Stickstoff in der Leber.

VI. Besprechung der Ergebnisse.

Unsere Versuche haben für den Chemismus der Leber mannigfache Veränderungen ergeben, sowohl durch Schilddrüsenentfernung allein, sodann weniger eingreifende bei den trächtigen Tieren und besonders durch Luftverdünnung.

Für die *trächtigen* Tiere ist das Material zu gering, so daß auf diese nur hingewiesen sei als Grundlage für weitere Untersuchungen. Die Veränderungen an den *thyreoidektomierten* Tieren sind deutlicher und hinsichtlich des Verhaltens der Leberstickstoffsubstanzen konstant. Die neuesten Darstellungen [*Raab*[1])] betonen, daß die Schilddrüse wohl

---

[1]) *W. Raab*, Hormone und Stoffwechsel, S. 52. München 1926.



für den quantitativen Eiweißabbau von Bedeutung sei, aber für den qualitativen kaum eine Rolle spielen dürfte. Was das Organ- (Leber-) Eiweiß betrifft, ist diese Anschauung nach unseren Ergebnissen jedenfalls nicht zutreffend. Im *Hunger* sollen nach *Heffter* die Mengen des Ätherextrakts und des Lecithins in der Leber abnehmen. Bei unserer Hungerratte lag wohl die Menge des Ätherextrakts verhältnismäßig niedrig, nicht aber die Gesamtphosphormenge, die vielmehr abnorm hoch war. Beim Hungermeerschweinchen war gleichfalls die Ätherextraktmenge relativ gering, die des Gesamtphosphors aber höher als bei allen anderen Meerschweinchen.

Die *Luftverdünnung* hat sich nach verschiedenen Richtungen hin ausgewirkt. Sie war sehr beträchtlich, aber bei neueren sportlichen Unternehmungen und in der Aviatik werden derartige Luftverdünnungen erreicht, bei letzteren noch überschritten, so daß ihr auch eine gewisse praktische Bedeutung zukommt. Die gefundenen Wirkungen entsprechen, soweit anderweit den unseren analog durchgeführte Untersuchungen vorliegen, verschiedenen seit langer Zeit bekannten *pathologischen* Befunden. Die Verteilung der stickstoffhaltigen Substanzen der Leber entspricht der der Injektion von Proteinkörpern, die *Pick* und *Hashimoto*[1]) schon vor längerer Zeit auffanden, und der, die *Jacoby*[2]) und weiterhin *Desqueyroux*[3]) bei Phosphorvergiftung feststellten. Der Phosphorvergiftung entspricht auch vollkommen das äußere und das histologische Bild der Lebern bei unseren Meerschweinchen — wenig dagegen bei den Ratten —, sowie auch das Verhalten der Ätherextrakte. Letztere sind auch bei der Phosphorvergiftung mehr oder weniger reich an Phosphor. *Heffter* hatte für seine Kaninchen und Hunde angegeben, daß diejenigen Tiere, die den höchsten Lecithingehalt, d. h. also P-Gehalt des Ätherextrakts hatten, nicht das Bild der gelben teigigen Fettleber boten, sondern Lebern von normaler braunroter Farbe. Bei den *Ratten* haben wir letzteres morphologische Verhalten und dabei einen weit höheren P-Gehalt im Ätherextrakt als bei den Meerschweinchen gefunden, was als Analogie zu *Heffters* Befunden angeführt sei. Auch die Steigerung der *relativen* Lebergewichte, die nach *Heffter* bei der Phosphorvergiftung vorhanden ist, findet sich bei unseren Meerschweinchen wieder; bei den Ratten kommt sie nur in einzelnen Fällen zum Vorschein.

Was das *Zustandekommen der Leberverfettung* betrifft, so soll auf die Frage der *Einwanderung* des Fettes nicht näher eingegangen werden.

---

[1]) *Pick* und *Hashimoto*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **76**, 89, 1914.
[2]) *Jacoby*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**, 1900.
[3]) *Desqueyroux*, C. r. biol. **86**, 143.

Bei den Meerschweinchen läßt sich aus der zum Teil sehr beträchtlichen Zunahme des Ätherextrakts, die trotz deren Unterernährung zustande kommt, nur unsicher schließen, daß es sich um eine solche handelt. Jedenfalls kann man aber sagen, daß die histologisch nachweisbare Verfettung nicht einfach dadurch entstanden ist, daß etwa, wie für den Zustand der Acidose, die bei den hohen Graden der Luftverdünnung, die wir anwendeten, vorliegt[1]), geltend gemacht wurde, „kolloiddisperse“ Fettmassen durch Entmischung sichtbar gemacht worden seien [*Rubow*[2]), *Schade*[3]), *Fischer*[4])]. Bei den Ratten ist nicht durchweg unter Luftverdünnung eine Ätherextraktzunahme festzustellen. Dagegen läßt sich aus dem Verhalten des Phosphors schließen, daß eine Einwanderung phosphorhaltiger Substanzen stattgefunden hat, denn die P-Werte liegen meist beträchtlich über den normalen. Allerdings die *Natur* der einwandernden P-haltigen Stoffe ist nicht ohne weiteres zu nennen; es sind jedenfalls nicht, oder doch nicht ausschließlich Lipoide — von Lecithin kann bei den Ratten nicht gesprochen werden (vgl. S. 311) —, da der Phosphor im Äther*rückstand* konstanter und beträchtlicher gesteigert ist als im Ätherextrakt, im Gegensatz zu den Meerschweinchen, wo er im Ätherextrakt steigt, im Rückstande sinkt. Bei den Ratten trifft auch die von *Stolnikow*[5]) für die Phosphorvergiftung geäußerte Anschauung nicht zu, daß Nucleinsubstanzen den Kern verlassen und zur Bildung ätherlöslicher Phosphorverbindungen Anlaß geben, wenn der Vorgang überhaupt als möglich angenommen wird.

Als *Ursache* aller Veränderungen kann die erzeugte Acidose betrachtet werden. Dem entspricht auch der Glykogenmangel der unter Luftverdünnung gewesenen Tiere, der auch bei der Phosphorvergiftung vorkommt.

Mit den chemischen schweren Veränderungen der Leber gehen *funktionelle* einher, auf die an anderer Stelle schon hingewiesen wurde[6]): Zunahme der Harnsäuremenge im Blute, vermehrter Urobilinogengehalt des Harns; auch die Senkungen der Körpertemperaturen, die wir fanden, sind bei schweren Leberinsuffizienzen festgestellt worden[7]), denen die Wirkungen starker Luftverdünnung auf die Leber entsprechen.

---

[1]) Vgl. *Loewy*, Der heutige Stand der Physiologie des Höhenklimas, S. 31. Berlin 1926.

[2]) *V. Rubow*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **52**, 173, 1905.

[3]) *Schade*, *Neukirch* und *Halpert*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **24**, 51.

[4]) *M. H. Fischer*, Kolloidchem. Zeitschr. **8**, 159, 1911.

[5]) *S. Stolnikow*, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1887, Supplement.

[6]) *Loewy*, Stand der Physiologie usw., S. 56.

[7]) Vgl. *Fischler*, Physiol. u. Pathol. d. Leber, 2. Aufl., 1925.

Haup…

Tierart.	Meerschweinchen										
Versuchsbedingungen	Unter Luftverdünnung							Masttiere		Hungertier	Normaltiere
1. Tier	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1. 3. 4. …
2. Dauer des Versuchs . Std.	48	24	12	36	60	48	108	336	144	72	0,1
3. Barometerdruck (cf. Protokolle) . . . . mm Hg	340	260	260	280	280	260	in min. 250	—	—	—	251
4. Gewicht der Tiere vor dem Versuch . . . . . g	370	360	400	490	480	456	530	478	307	470	658
5. Gewicht der Tiere nach dem Versuch . . . . g	300	320	325	410	320	364	348	526	355	349	–
7. Gewicht der Leber . . g	8	12,6	12,3	15,8	17,2	19,2	24,3	41,5	15,7	9.5	35,1
6. Anteil der Leber am Tiergewicht . . . . %	2,7	3,94	3,07	3,86	5,38	5,28	7,00	7,77	4,42	2.72	5,34
8. Trockensubst. d. Leber g	2,20	3,00	3,25	4,27	4,70	5,13	6,78	12,37	4,47	2.48	9,48
9. „ in % des Lebergewichts	27,48	23,76	26,39	26,98	27,48	26,70	27,89	29,81	29,82	26,07	27,[illegible]2
10. Wassergehalt d. Leber %	72,59	76,24	73,61	73,02	72,52	73,30	72,11	70,19	70,18	73,93	72,8
11. Ätherextrakt, Gesamtmenge . . . . . . mg	—	584	716	1073	881	842	1954	730,4	410,3	389	1018
12. Ätherextrakt . . . % der feuchten Leber	—	4,63	5,82	5,97	5,13	4,39	8,04	1,76	2,61	4.10	2,[illegible]
13. Ätherextrakt . . . % der trockenen Leber	—	19,46	22,04	25,14	18,64	16,42	28,82	5,90	9,18	15.74	10,74
14. Ätherrückstand . . . g	—	2,416	2,52	3,33	3,82	4,29	4,83	11,64	4,14	2,09	8,46
15. „ . % der trockenen Leber	—	80,54	77,96	77,90	81,36	83,58	71,18	94,10	90,82	84,26	89,26
16. Alkoholextrakt, Gesamtmenge . . . . g	—	—	—	1667	1526	1810	2507	3991	1239	534,9	
17. Alkoholextrakt der feuchten Leber . . . . . %	—	—	—	10,55	8,87	9,43	10,32	9,62	7,65	5.63	
18. Alkoholextrakt der trockenen Leber . . . . . %	—	—	—	39,04	32,47	35,29	36,98	32,26	26,86	27.15	
19. Alkoholrückstand . . . g	—	—	—	2,60	3,17	3,32	4,27	8,38	3,23	1.94	
20. „ % der trockenen Leber	—	—	—	60,96	67,53	64,71	63,02	67,74	73,14	72.85	
21. Phosphor, Gesamtmenge im Ätherextrakt . . mg	—	5,50	6,38	14,10	23,85	29,80	43,82	17,90	30,44	16,86	6,04
22. Phosphor, Gesamtmenge im Ätherrückstand mg	—	34,42	18,53	34,94	33,97	33,75	45,97	129,6	42,72	38,47	106,7
23. Phosphor, Gesamtmenge in der Leber . . . mg	—	39,92	24,91	51,00	57,82	63,55	89,79	147,5	73,16	55,33	166,7
24. Phosphor, % d. Trockensubstanz der Leber	—	1,331	0,766	1,148	1,230	1,239	1,324	1,192	1,637	2,231	1,758
25. Phosphor, % der feuchten Leber	—	0,317	0,203	0,323	0,336	0,331	0,370	0,355	0,466	0,582	0,475
26. Gehalt des Ätherextrakts an P . . . . %	—	0,941	0,891	1,496	2,707	3,547	2,243	2,518	0,742	4,333	5,897
27. Gehalt des Ätherrückstandes an P . . . %	—	1,425	0,735	1,049	0,889	0,787	0,952	1,113	1,032	1,841	1,261
28. P des Ätherextrakts auf Lecithin berechnet . mg	—	141,6	164,3	363,0	614,1	767,3	112,8	460,9	783,6	434,0	154,6

...elle.

	Ratten													
	...rächtige Tiere	Unter Luftverdünnung				Hunger-tier	Unter Luftverdünnung				Nach Thyreoidektomie unter Luftverdünnung			Thyreoid-ektomiert
2	7	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
.1	1	72	120	96	89	72	84	84	61	84	120	120	120	48
50	330	230-250	240	in min. 240	in min. 220	—	240-200	240-200	220-200	260-200	in min. 230	in min. 230	230	—
18	168	217	225	136	133	102	84	97	123	117	96	98	84	63
–	—	174	168	103	96	85	72	81	115	112	82	85	75	66
.1	11,2	6,85	7,2	3,9	5,4	1,75	4,25	5,0	5,25	4,40	3,55	3,65	3,80	3,1
.63	6.67	3,94	4,29	3,79	5,63	2,06	5,90	6,17	4,57	3,93	4,33	4,29	5,07	4,70
.53	3,05	2,27	2,22	1,24	1,98	0,525	1,12	1,46	1,45	1,39	1,12	1,16	1,16	0,946
.05	27.27	33,08	30.77	31,87	27,27	30,00	26,23	29,13	27,64	31,52	31.63	31,87	30,64	30,53
.95	72,73	66,92	69,23	68,13	72,73	70,00	73,77	70,87	72,36	68,48	68,37	68,13	69,36	69,47
2.9	383,8	379,7	299,3	218,3	297,2	70,67	124,5	168,5	249,5	184,9	120,4	119,0	144,5	121,9
.57	3,43	5,54	4,16	5,60	5,50	4,04	2,93	3,37	4,75	4,30	3,39	3,26	3,80	3,93
.25	12.57	16,76	13.48	17,61	15,01	13,46	11,17	11,57	17,19	13,33	10,75	10,26	12,45	12,88
.97	2,77	1,89	1,82	1,02	1,68	0,454	1,00	1,29	1,20	1,20	1,00	1,04	1,02	0,824
.75	87,43	83,24	86,52	82,39	84,99	86,54	88,83	88,43	82,81	86,67	89,25	89,74	87,55	87,12
.87	25,81	12,46	17,99	19,71	31,86	25,08	10.23	7,38	11,28	20,60	9,03	10,00	8,25	13,30
.20	51,32	32,24	36,65	32,15	23,59	16,56	17,94	51,30	15,25	20,92	8,56	21,20	50,54	19,33
.07	77,13	44,70	54,64	51,86	55,45	41,64	28,17	58,68	26,53	41,52	17,59	31,20	58,79	32,63
295	2,529	1,969	2,461	4,182	2,800	7,931	2,527	4,029	1,830	2,987	1,571	2.690	5,068	3,449
575	0.689	0,653	0,759	1,329	1,027	2,380	0,663	1,174	0,505	0,944	0,496	0,855	1,547	1,053
129	6,723	3,281	6,011	9,028	10,72	35,50	8,220	4,380	4,520	11,14	7,503	8,410	5,750	10,91
482	1,853	1,706	2,014	3,152	1,404	3,648	1,794	3,976	1,270	1,743	0,856	2,040	3,036	2,346
3.3	664,5	320,8	463,2	507,5	820,2	645,9	235,8	190,0	290,5	530,4	232,6	257,5	214,0	342,4

Weitere Untersuchungen über die optimale Dosierung für die Stoffwechselwirkung des aktiven Eisenoxyds[1]).

Von

Gerhard Rosenkranz.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 5. April 1927.)

Nachdem durch die Arbeit von *Wada* nachgewiesen worden war, daß bei Kaninchen mit qualitativ gleichartiger Ernährung die perorale Gabe von 2,5 mg aktiven Eisenoxyds pro Kilogramm Körpergewicht eine Herabsetzung in der Harn-N-Ausfuhr bei ungefähr gleichbleibender Ausfuhr des dysoxydablen C mit konsekutiver starker Steigerung des Harnquotienten C : N herbeiführt, und nachdem *Remesow* gezeigt hatte, daß beim Hunde mit qualitativ und quantitativ genau dosierter Nahrungszufuhr, die kalorisch suffizient war und eine Konstanz des Körpergewichts garantierte, unter der Wirkung der peroralen Gabe von 10 mg aktivem Eisenoxyd pro Kilogramm Körpergewicht in der Regel eine verbesserte Nahrungsresorption, eine Einschränkung in der Eiweißoxydation, eine Steigerung der Positivität der N-Bilanz und Änderungen in der Oxydation der N-freien Substanzen auftraten, war es wünschenswert, Genaueres über die optimale Dosierung dieses Eisens zu erfahren, um die geschilderten Stoffwechseländerungen, vor allem die Einschränkung in der Eiweißoxydation und die Senkung der Harn-N-Werte zu erzielen. Bei den *Remesow*schen Versuchen war bei einem Hunde unter der Wirkung der Gaben von 10 mg Eisenoxyd pro Kilogramm Körpergewicht die C-Ausfuhr durch den Harn gesteigert, bei dem anderen Hunde unter gleichen Versuchsbedingungen aber vermindert. Beim ersten Hunde war die N-Ausscheidung durch den Harn im Verhältnis zur N-Resorption immer vermindert, solange eine Eisenwirkung bestand, bei dem zweiten Hunde war auch zunächst unter der Eisenwirkung die N-Ausscheidung durch den Harn herabgesetzt, aber später, besonders bei einer erneuten Eisenzufuhr, gesteigert. Es war also bei

---

[1]) Dieses aktive Eisenoxyd wird von der Auergesellschaft in Berlin unter dem Namen „*Siderac*“ in den Handel gebracht.

diesem zweiten Hunde von Anfang an wohl eine Steigerung in der C-Oxydation vorhanden, im späteren Verlauf des Versuchs trat dazu dann auch eine Steigerung in der Oxydation der N-haltigen Substanz.

Der Gedanke lag nahe, daß 10 mg Eisenoxyd pro Kilogramm Körpergewicht beim Hunde schon jenseits der Grenze liegen, die eingehalten werden muß, um regelmäßig die Einschränkung in der Oxydation zu sehen, die von *Wada* beim Kaninchen bei einer Dosierung von 2,5 mg Eisenoxyd beobachtet worden war. Ich habe daher im übrigen unter genauer Einhaltung der *Remesow*schen Versuchsanordnung an zwei gesunden Hunden, die bisher zu keinerlei Versuchen benutzt worden waren, den Einfluß der peroralen Gabe bei meinem Hunde 1 von 2,5 mg und bei meinem Hunde 2 von 5 mg aktivem Eisenoxyd auf den Stoffwechsel untersucht.

Ich weise noch darauf hin, daß alle im Vorstehenden angeführten Versuche mit dem nach der *Baudisch*schen Methode präparierten aktiven Eisenoxyd angestellt wurden, und zwar die Versuche von *Wada* und *Remesow* mit Eisenoxyd, das ad hoc im hiesigen Laboratorium nach *Baudisch* hergestellt worden war, meine eigenen Versuche mit aktivem Eisenoxyd, das von Herrn Dr. *Baudisch* selbst im *Rockefeller*-Institut in New York hergestellt und uns freundlichst überlassen worden war.

Das Ergebnis meiner eigenen Versuche nehme ich hier voraus und lasse dann im experimentellen Teil meiner Arbeit die Versuchsprotokolle folgen.

Beim Hunde 1 führte die perorale Gabe von 2,5 mg aktiven Eisenoxyds pro Kilogramm Körpergewicht zu folgenden Erscheinungen am Stoffwechsel:

1. Die Nahrungsausnutzung im Darm verbesserte sich, da die täglichen Kot-N- und Kot-C-Werte zurückgingen.

2. Die N-Ausscheidung durch den Harn sank.

3. Die Eiweißoxydation wurde um etwa 25% eingeschränkt.

4. Die C-Ausscheidung durch den Harn stieg an.

5. Der Harnquotient C : N erhob sich infolge der steigenden C-Ausfuhr und der sinkenden N-Ausfuhr durch den Harn.

6. Das Körpergewicht blieb konstant.

Beim Hunde 2 führte die perorale Gabe von 5,0 mg aktiven Eisenoxyds pro Kilogramm Körpergewicht zu folgenden Erscheinungen:

1. Die Nahrungsausnutzung im Darm verbesserte sich, da die täglichen Kot-N- und Kot-C-Werte zurückgingen.

2. Die N-Ausscheidung durch den Harn sank.



3. Die Eiweißoxydation wurde um etwa 14% eingeschränkt.

4. Die C-Ausscheidung durch den Harn stieg an.

5. Der Harnquotient C : N erhob sich infolge der steigenden C-Ausfuhr und der sinkenden N-Ausfuhr durch den Harn.

6. Das Körpergewicht blieb konstant.

7. Nach Aussetzen der Eisenmedikation ist eine lange Nachwirkung nachweisbar.

Man ersieht aus alledem, daß die Ergebnisse der Versuche an beiden Hunden prinzipiell identisch sind. Bei geeigneter Dosierung — wir werden wohl 2,5 bis 5,0 mg aktives *Baudisch*sches Eisenoxyd pro Kilogramm Körpergewicht und pro Tag bei peroraler Zufuhr als eine solche ansehen dürfen — findet bei einer Verbesserung der Nahrungsausnutzung im Darm, also bei gesteigerter C- und N-Resorption, eine starke Einschränkung in der Eiweißoxydation und nach Maßgabe der erhöhten Werte des dysoxydablen Harn-C wohl auch eine zum mindesten qualitative Herabsetzung in der Oxydation der N-freien C-haltigen Substanz (Fette und Kohlehydrate) statt, wofern dieses Phänomen nicht aus einer Steigerung der Fett- und Kohlehydratoxydation in quantitativer Beziehung hergeleitet werden darf.

Wenn man meine Versuche mit denjenigen von *Wada* und *Remesow* in Beziehung setzt und auch die Gaswechselversuche *Arnoldis* an Ratten bei Fütterung mit diesem aktiven Eisenoxyd hier heranzieht (*Arnoldi* hatte als Nachwirkung eine Steigerung des O_2-Verbrauchs bei gleichbleibendem respiratorischen Quotienten gefunden), dann kommt man zu der Auffassung, daß die regelmäßige und primäre Stoffwechselwirkung bei der optimalen Gabe von aktivem Eisen die Einschränkung der Eiweißoxydation, vielleicht auch eine Einschränkung des gesamten Umsatzes ist. Wieweit das am Lungengaswechsel zum Ausdruck kommt, bedarf noch der Untersuchung. Bei nicht optimaler Dosierung, d. h. Überschreitung der optimalen Dosis nach oben, und vielleicht auch in Abhängigkeit von dem allgemeinen Ernährungszustande und der individuellen Ansprechbarkeit des Organismus auf das aktive Eisen, sieht man zunächst während oder im Anschluß an die Eisengabe Steigerungen in der Oxydation der N-freien Substanz und endlich auch ausnahmsweise einmal Steigerungen in der Eiweißoxydation auftreten.

Experimenteller Teil.

Im Versuch befanden sich zwei gesunde, noch nicht im Versuch gewesene Hunde, Hund 1 und 2. Die Ernährung bestand täglich aus der gleichen Menge Weizeneiweiß, Reis, Hefe, Butter und Kochsalz, so daß bei einer Kalorienzufuhr von 80 Cal pro Kilogramm Körpergewicht und

einer Gesamt-N-Zufuhr von 7,4588 g pro Tag bei Hund 1 und 5,83 g bei Hund 2 Gewichtskonstanz und eine schwach positive N-Bilanz garantiert wurde. Tägliche N-Bilanz Hund 1 = + 1,2505, Hund 2 = + 0,18.

Ferner bekamen beide Hunde täglich 1,5 g Zellsalz (s. Tabelle III). Der gesamte Versuch dauerte bei Hund 1 15 Tage, bei Hund 2 45 Tage. Der Kohlenstoff wurde nach der Methode von *Tangl-Keresky* in der Modifikation von *Gomez* bestimmt. Es wurden regelmäßig Doppelanalysen angestellt und nur übereinstimmende Resultate verwendet. Der Stickstoff wurde nach *Kjeldahl* bestimmt. Der tägliche Harnquotient C : N wurde aus der in 24 Stunden spontan entleerten Urinmenge berechnet. Beide Hunde wurden in je einer Vorperiode gehalten, die bei Hund 1 und 2 je 8 Tage betrug und in der eine fast absolute Konstanz des Quotienten C : N bestand. Erst dann wurde die Hauptperiode angeschlossen. In der Hauptperiode wurde Eisen gegeben. Bei Hund 2 wurde an die Hauptperiode noch eine Nachperiode ohne Eisenmedikation angefügt, um die Nachwirkung zu studieren. Hund 1 erhielt 2,5 mg aktives Eisenoxyd pro Kilogramm Körpergewicht, Hund 2 5,0 mg.

Die einzelnen Perioden wurden voneinander durch Carmin, das morgens mit einer kleinen Nahrungsmenge gegeben wurde, abgegrenzt. Carminhaltiger Kot wurde nicht zur Analyse verwendet. Der Kot wurde nach *Poda* präpariert, d. h. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, die Trockenkotmenge bestimmt, gestoßen und gemahlen, dann zur Analyse verwendet. Die Kotbestimmungen wurden nur periodenweise angestellt. Die tägliche N-Bilanz wurde aus der pro Tag für den Periodendurchschnitt berechneten Kot-N-Menge, der durch die Nahrung zugeführten N-Menge und der pro Tag für den Periodendurchschnitt errechneten Harn-N-Menge bestimmt. Die prozentuale Eiweißoxydation wurde folgendermaßen berechnet: Von der pro Periode festgestellten Nahrungs-N-Menge wurde die Perioden-Kot-N-Menge subtrahiert und das Resultat in Beziehung zur Perioden-Harn-N-Menge gesetzt. Ein Beispiel für Hund 1 möge dies kurz erläutern: Es sei 59,6704 g Nahrungsperioden-N, 6,4260 g Perioden-Kot-N, 43,2424 g Harn-Perioden-N; daraus ergibt sich: 53,2444 : 43,2424 = 100 : X.

$$X = \frac{43{,}2424 \cdot 100}{53{,}2444} = 81{,}2\,\%$$ N-Ausnutzung für die Vorperiode.

Der Harnquotient C : N für den Periodendurchschnitt wurde aus der gesamten Harn-C-Menge, dividiert durch die gesamte Harn-N-Menge in der Periode berechnet.

Tabelle I.

Nahrungsmitteltabelle Hund 1. Gewicht 11100 g am 9. Februar 1927.

Nahrungszufuhr etwa 80 Cal pro Kilogramm Körpergewicht.

Täglich:	1. Weizeneiweiß	= 45,0 g	= 6,0273 g N	= 169 Cal
	2. Reis	= 95,0 g	= 1,1704 g N	= 269 „
	3. Hefe	= 12,0 g	= 0,2611 g N	= 42 „
	4. Butter	= 45,0 g		= 418 „
	5. Kochsalz	= 1,5 g		
	6. Zellsalz	= 1,5 g		
		Insgesamt	= 7,4583 g N	= 898 Cal

Tabelle II.

Nahrungsmitteltabelle Hund 2. Gewicht 6600 g am 9. Februar 1927.
Nahrungszufuhr etwa 80 Cal pro Kilogramm Körpergewicht.

Täglich:	1. Weizeneiweiß	= 35,0 g	= 4,6879 g N	= 131 Cal
	2. Reis	= 80,0 g	= 0,9856 g N	= 227 „
	3. Hefe	= 6,0 g	= 0,1530 g N	= 21 „
	4. Butter	= 20,0 g		= 188 „
	5. Kochsalz	= 1,5 g		
	6. Zellsalz	= 1,5 g		
		Insgesamt	= 5,8265 g N	= 567 Cal

Tabelle III. Zellsalzgemisch.

Calc. phosphor.	= 100,0	Ferr. citr.	= 30,0
Mgn. citr.	= 100,0	Jodi puri	= 0,05
Kal. chlor.	= 15,0	Kal. jod.	= 0,1

Tabelle IV. Hund 1, Vorperiode.

Datum 1927	Körpergewicht g	24stündige Harnmenge	Harn-C	Harn-N	C : N	Trockenkotmenge pro Periode g	Tägliche N-Bilanz im Periodendurchschnitt	Bemerkungen
23. II.	9 900	740	3,1521	7,0549	0,446	101,0	+ 1,2505	Nahrung s. Tabelle 1. Während d. Periode kein Albumen, kein Zucker im Urin. Nahrung wird tägl. ganz genommen
24. II.	9 850	710	2,9410	6,1075	0,481		+ 1,2505	
26. II.	10 100	505	2,4013	5,4018	0,444		+ 1,2505	
27. II.	10 000	830	2,6076	5,7211	0,480		+ 1,2505	
28. II.	10 050	730	2,3749	5,4618	0,434		+ 1,2505	
1. III.	10 100	430	1,2481	3,9278	0,318		+ 1,2505	
2. III.	9 950	540	1,3694	3,7480	0,364		+ 1,2505	Karmin
3. III.	9 880	830	2,4061	5,8197	0,413		+ 1,2505	Ab 3. III. mittags 2,5 mg aktives Eisenoxyd pro kg Körpergew.

Tabelle V. Hund 1, Hauptperiode.

Datum 1927	24stündige Harnmenge	Körpergewicht g	Harn-C	Harn-N	C : N	Trockenkotmenge pro Periode g	Tägliche N-Bilanz im Periodendurchschnitt	Bemerkungen
4. III.	700	9 900	4,1860	6,8845	0,607	136,5	+ 2,5436	Nahrung s. Tabelle I. Nahrung wird tägl. aufgefressen. Tägl. 2,5 mg Fe_2O_3 pro kg
5. III.	570	10 050	2,0520	4,3442	0,473		+ 2,5436	Im Urin während der Periode kein Albumen, kein Zucker. Täglich Fe_2O_3 pro kg Körpergewicht 2,5 mg
6. III.	600	10 050	2,6802	4,8014	0,557		+ 2,5436	Täglich Fe_2O_3 pro kg Körpergewicht 2,5 mg (6.–9. III.)
7. III.	350	10 250	1,3930	3,5140	0,396		+ 2,5436	
8. III.	170	10 000	0,9962	1,8666	0,533		+ 2,5436	
9. III.	450	10 200	2,9650	3,4693	0,850		+ 2,5436	
10. III.	310	10 100	2,4490	4,1035	0,596		+ 2,5436	Täglich Fe_2O_3 pro kg Körpergew. Karmin. 2,5 mg

Tabelle VI.

Hund 2, Vorperiode.

Datum 1927	Körpergewicht g	24stündige Harnmenge	Harn-C	Harn-N	C : N	Trockenkotmenge pro Periode g	Tägliche N-Bilanz im Periodendurchschnitt	Bemerkungen
14. II.	6600	790	1,8564	5,6638	0,327	123,5	+ 0,18	Nahrung s. Tabelle II. Nahrung wird tägl. aufgefressen
15. II.	6700	800	1,7081	5,5934	0,318		+ 0,18	Während der ganzen Periode kein Albumen, kein Zucker im Urin
16. II.	6600	610	1,8438	5,2710	0,353		+ 0,18	
17. II.	6670	640	1,4265	5,0212	0,284		+ 0,18	
18. II.	6610	500	1,4298	4,5533	0,314		+ 0,18	
19. II.	6600	580	1,6190	5,1002	0,317		+ 0,18	
20. II.	6600	630	1,5323	4,8732	0,314		+ 0,18	
21. II.	6550	640	1,2690	4,4833	0,283		+ 0,18	Karmin

Tabelle VII.

Hund 2, Hauptperiode.

Datum 1927	Körpergewicht g	24stündige Urinmenge	Harn-C	Harn-N	C : N	Trockenkotmenge pro Periode g	Tägliche N-Bilanz im Periodendurchschnitt	Bemerkungen
22. II.	6550	650	1,4560	4,7779	0,304	66,5	+ 0,92	Nahrung s. Tabelle II. Nahrung wird tägl. aufgefressen. Tägl. 5 mg Fe_2O_3 pro kg
23. II.	6550	540	1,6074	5,4207	0,296		+ 0,92	Während der ganzen Periode im Urin kein Albumen, kein Zucker
24. II.	6400	450	2,5700	4,6233	0,556		+ 0,92	Täglich 5 mg Fe_2O_3 pro kg Körpergew.
25. II.	6550	660	2,0410	4,8073	0,425		+ 0,92	
26. II.	6550	600	3,7532	4,2366	0,885		+ 0,92	
27. II.	6600	620	3,7638	4,1694	0,902		+ 0,92	
28. II.	6550	650	3,4218	4,8267	0,708		+ 0,92	
1. III.	6550	540	2,7000	4,2364	0,637		+ 0,92	
2. III.	6400	650	2,7711	4,2405	0,855		+ 0,92	
3. III.	6550	770	2,7483	3,0890	0,544		+ 0,92	
4. III.	6480	850	3,2072	5,3361	0,601		+ 0,92	Täglich 5 mg Fe_2O_3 pro kg Körpergew. Karmin

Tabelle VIIIa.

Hund 2, Nachperiode 1.

Datum 1927	Körpergewicht g	24stündige Urinmenge	Harn-C	Harn-N	C : N	Trockenkotmenge für Nachperiode 1 + 2 g	Tägliche N-Bilanz im Periodendurchschnitt	Bemerkungen
5. III.	6550	640	3,5046	5,0391	0,695	203,5	+ 0,25	Nahrung s. Tab. II. Wird ganz aufgefressen. Während der Periode im Urin kein Albumen, kein Zucker
6. III.	6520	700	3,8181	5,1240	0,745		+ 0,25	
7. III.	6540	630	2,5091	4,8364	0,518		+ 0,25	
8. III.	6510	680	3,3590	4,5729	0,734		+ 0,25	
9. III.	6550	530	2,6606	4,1136	0,646		+ 0,25	
10. III.	6500	720	3,6864	5,1069	0,721		+ 0,25	
11. III.	6500	610	2,8072	5,5309	0,525		+ 0,25	
12. III.	6530	600	3,5280	4,7746	0,738		+ 0,25	
13. III.	6550	550	3,1376	5,0661	0,619		+ 0,25	
14. III.	6500	690	2,9438	4,9043	0,600		+ 0,25	
15. III.	6500	560	2,9466	4,3112	0,684		+ 0,25	
16. III.	6400	600	3,6496	4,7626	0,766		+ 0,25	
17. III.	6500	440	2,7623	4,9931	0,533		+ 0,25	
18. III.	6500	730	2,8395	4,7204	0,601		+ 0,25	
19. III.	6500	590	3,8205	5,4058	0,706		+ 0,25	

Tabelle VIIIb.

Hund 2, Nachperiode 2.

Datum 1927	Körpergewicht g	24stündige Urinmenge	Harn-C	Harn-N	C : N	Trockenkotmenge pro Periode 1+2 g	Tägliche N-Bilanz im Periodendurchschnitt	Bemerkungen
20. III.	6380	780	2,9702	5,1109	0,581	203,5	+ 0,25	Nahrung s. Tabelle II. Futter wird tägl. aufgefressen
21. III.	6450	530	2,9886	5,1977	0,575		+ 0,25	Während der Periode kein Albumen, kein Zucker im Urin
22. III.	6300	600	3,1772	7,2047	0,441		+ 0,25	
23. III.	6300	550	3,0421	6,8479	0,444		+ 0,25	
24. III.	6400	530	3,0634	4,5955	0,666		+ 0,25	
25. III.	6300	620	3,0014	5,3249	0,563		+ 0,25	
26. III.	6300	590	3,0916	4,6087	0,670		+ 0,25	
27. III.	6200	630	2,0019	3,6090	0,554		+ 0,25	
28. III.	6200	550	4,2460	5,4612	0,777		+ 0,25	
29. III.	6200	600	2,6244	6,2111	0,422		+ 0,25	
30. III.	6250	520	3,0680	5,8401	0,502		+ 0,25	
31. III.	6230	790	2,5091	4,8364	0,518		+ 0,25	

Tabelle IX.

Hund 1.

Harn-C g	Harn-N g	C : N	Kot-C g	Kot-N g	Nahrungs-N g	Eiweiß-oxydation %	N-Bilanz
im Durchschnitt pro Tag in der Periode							
Vorperiode.							
2,3125	5,4053	0,427	2,09	0,803	7,4588	81,2	+ 1,2505
Hauptperiode.							
2,3887	4,1405	0,571	1,89	0,576	7,4588	60,1	+ 2,5463

Tabelle X.

Hund 2.

Harn-C g	Harn-N g	C : N	Kot-C g	Kot-N g	Nahrungs-N g	Eiweiß-oxydation %	N-Bilanz
im Durchschnitt pro Tag in der Periode							
Vorperiode.							
1,5856	5,0699	0,312	1,60	0,577	5,83	96,5	+ 0,18
Hauptperiode.							
2,7289	4,6171	0,591	1,04	0,301	5,83	83,5	+ 0,92
Nachperiode 1.							
3,1982	4,8841	0,654	1,35	0,44	5,83	95	+ 0,25
Nachperiode 2.							
3,0478	5,5557	0,548	1,35	0,44	5,83	95	+ 0,25

Literatur.

Arnoldi, zit. nach Manuskript, erscheint in Folia hämatologica 1927. — *Gomez*, diese Zeitschr. **167**, 424, 1926. — *Poda*, Hoppe-Seyler **25**, 1898. — *Remesow*, zit. nach Manuskript. — *Wada*, diese Zeitschr. **175**, 62, 1926.

Zur Frage nach dem Einfluß der Arsen- und Antimonverbindungen auf die fermentativen Funktionen des Organismus.

IV. Mitteilung[1]):

Die Ursache des hemmenden Einflusses von Brechweinstein auf die Speichelamylase.

Von

J. A. Smorodinzew und Fr. E. A. Iliin.

(Aus dem Laboratorium für biologische Chemie der II. Moskauer Staatsuniversität.)

(Eingegangen am 6. April 1927.)

Bei Untersuchung des Einflusses einiger Präparate von As und Sb auf die Speichelamylase haben wir gefunden[2]), daß Brechweinstein in einer Konzentration von 0,002 bis 0,6 % die Stärkespaltung hemmt. Aus von uns unabhängigen Gründen konnten wir damals den Einfluß der aktiven Reaktion auf den Prozeß nicht untersuchen und wollen darum jetzt eine unsere frühere Arbeit ergänzende Mitteilung machen. Die Untersuchung wurde nach der *Wohlgemuth*schen Methode ausgeführt.

Zunächst haben wir im einzelnen das p_H sämtlicher Bestandteile des verdauten Gemenges, d. h. einer 0,1 % Lösung löslicher Stärke, einer 0,05 % Stärkelösung (entsprechend ihrer Konzentration im verdauten Gemenge), von aktivem und gekochtem wasserverdünnten Speichel, von Brechweinstein verschiedener Konzentration und eines Gemenges dieser Stoffe in der Ausgangsflüssigkeit (wie im ersten Probierglas), sowie auch in einer Probe, welche die zur Verdauung der gegebenen Stärkemenge genügende minimale Fermentmenge enthielt, bestimmt (Tabelle I).

Tabelle I zeigt, 1. daß die aktive Reaktion der Stärke bei kolorimetrischer Bestimmung alkalischer ist als bei der elektrometrischen

[1]) III. Mitteilung: *J. A. Smorodinzew* und *N. P. Riabuschinsky*, diese Zeitschr. **168**, 73, 1926.

[2]) *J. A. Smorodinzew* und *Fr. E. A. Iliin*, ebendaselbst **141**, 297, 1923.

Tabelle I.

Ausgangslösungen und Gemenge ohne Brechweinstein.

Nr. der Versuche	Substrat	Bestimmung von p_H der Lösung				
		Elektrometrisch			Kolorimetrisch	
		Temp.	π	p_H	ohne Puffer	mit Puffer
1.	0,1 % Stärkelösung	16°	0,5189	$4,66_7$	5,5	6,0
2.	0,1 % „	18	0,5244	$4,74_8$	6,2	6,1
3.	0,05 % „	19	0,5404	$5,02_2$	5,1	6,0
4.	0,05 % „	20	0,5277	$4,79_8$	4,6	6,0
5.	Speichel 1 : 25	16	0,6004	$6,08_2$	6,3	6,3
6.	„ 1 : 25	17	0,6104	$6,24_9$	6,2	6,3
7.	„ 1 : 25 gekocht	17	0,6024	$6,11_0$	6,2	6,1
8.	„ 1 : 25 „	17	0,6005	$6,07_7$	6,2	6,1
9.	Brechweinstein 0,01 mol.			—	4,6	
10.	„ 0,01 „			—	4,6	
11.	„ 0,02 „			—	4,4	
12.	„ 0,02 „			—	4,4	
13.	„ 0,125 „			—	3,8	
14.	„ 0,125 „				3,8	
15.	2 Teile 0,1 % Stärke + 1 Teil Speichel 1 : 25 + 1 Teil H_2O vor der Verdauung	17	0,5412	$5,04_7$	6,6	6,5
16.	Dasselbe nach der Verdauung während 30′ bei 38° C	16	0,5809	$5,74_2$	5,8	6,3
17.	2 Teile 0,1 % Stärke + 1 Teil Speichel 1 : 25 + 1 Teil H_2O vor der Verdauung	13	0,5685	$5,54_8$	6,0	6,0
18.	Dasselbe nach der Verdauung während 30′ bei 38° C	14	0,5390	$5,04_9$	5,8	6,3
19.	2 Teile 0,1 % Stärke + 1 Teil Speichel 1 : 100 + 1 Teil H_2O vor der Verdauung	20	0,5555	$5,27_7$	6,0	6,5
20.	Dasselbe nach der Verdauung während 30′ bei 38° C	20	0,5449	$5,09_4$	6,4	6,3
21.	2 Teile 0,1 % Stärke + 1 Teil Speichel 1 : 100 + 1 Teil H_2O vor der Verdauung	17	0,5652	$5,46_3$	5,8	6,6
22.	Dasselbe nach der Verdauung während 30′ bei 38° C	15	0,5650	5,47	5,8	6,2

Methode, 2. daß die Brechweinsteinlösungen eine saure, mit der Salzkonzentration zunehmende Reaktion haben und 3. daß p_H des Gemenges nach *Wohlgemuth* (ohne Brechweinstein) für die Speichelamylase unter dem Optimum liegt und sich während der Verdauung fast gar nicht ändert.

Ferner haben wir die Veränderung der aktiven Reaktion des Mediums nach Zusatz von Brechweinstein zum verdauten Gemenge beobachtet (Tabelle II).

Diese Tabelle II zeigt, daß ein Zusatz von Brechweinstein die Reaktion des Gemenges in saurer Richtung verschiebt und die Ver-

Tabelle II. Das verdaute Gemenge besteht aus 2 Teilen einer 1 ‰ Stärkelösung, aus 1 Teil Brechweinstein von angegebener Konzentration oder Wasser und aus 1 Teil Speichel 1 : 25; die Fermentverteilung wurde mit Hilfe von H_2O vorgenommen; Verdauungsdauer 30′ bei 38°.

Nr. der Versuche	Reagens	Konzentration des Brechweinsteins mol.	Bestimmung von p_H des Gemenges im ersten Probierglase: Elektrometrisch, vor der Verdauung	Elektrometrisch, nach der Verdauung	Kolorimetrisch, ohne Puffer, vor der Verdauung	ohne Puffer, nach der Verdauung	mit Puffer, vor der Verdauung	mit Puffer, nach der Verdauung	Bestimmung von p_H des Gemenges im letzten Probierglase: Elektrometrisch, vor der Verdauung	Elektrometrisch, nach der Verdauung	Kolorimetrisch, ohne Puffer, vor der Verdauung	ohne Puffer, nach der Verdauung	mit Puffer, vor der Verdauung	mit Puffer, nach der Verdauung	Nr. des letzten farblosen Probiergläschens	Menge der Fermenteinheit
23	H_2O	—	5,57	$5,69_3$	6,0	5,8	6,0	6,3	$5,46_3$	5,47	5,8	5,8	5,6	5,6	5	32
24	$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	0,01	—	—	5,8	5,8	5,8	5,8	—	—	4,7	4,7	5,0	5,0	2	4
25		0,01	—	—	6,0	6,0	6,0	6,0	—	—	4,8	4,8	5,2	5,2	2	4
26		0,02	—	—	5,8	5,8	5,8	5,8	—	—	4,7	4,8	5,2	5,4	2	4
27		0,02	—	—	5,8	5,8	5,8	5,8	—	—	4,8	4,8	5,2	5,4	2	4
28		0,125	—	—	5,4	5,4	5,6	5,6	—	—	4,4	4,4	4,4	4,4	5	32
29		0,125	—	—	5,4	5,4	5,6	5,6	—	—	4,4	4,4	4,4	4,4	6	64

Tabelle III. Das verdaute Gemenge besteht aus 2 Teilen einer 1 ‰ Stärkelösung, aus 1 Teil Brechweinstein in abnehmender Konzentration, mit Wasser verdünnt, und 1 Teil Speichel 1 : 200. Verdauungsdauer 30′ bei 38°.

Nr. der Versuche	Konzentration des Brechweinsteins mol.	Bestimmung von p_H des Gemenges kolorimetrisch: im ersten Probierglase, ohne Puffer, vor der Verdauung	im ersten, ohne Puffer, nach der Verdauung	im ersten, mit Puffer, vor der Verdauung	im ersten, mit Puffer, nach der Verdauung	im letzten Probierglase, ohne Puffer, vor der Verdauung	im letzten, ohne Puffer, nach der Verdauung	im letzten, mit Puffer, vor der Verdauung	im letzten, mit Puffer, nach der Verdauung	Nr. des letzten gefärbten Probierglases	Hemmende Konzentration: molar	% des Salzes im Gemenge	% von Sb im Gemenge
30	0,01	4,7	4,7	5,0	5,0	5,6	5,8	6,0	6,0	6	0,01 —0,0003	0,08—0,0025	0,025—0,000 78
31	0,01	4,7	4,7	5,0	5,0	5,6	5,8	6,0	6,0	6	0,01 —0,0003	0,08—0,0025	0,025—0,000 78
32	0,02	4,7	4,8	5,2	5,4	5,6	5,8	6,0	6,0	7	0,02 —0,0003	0,16—0,0025	0,05 —0,000 78
33	0,02	4,7	4,8	5,2	5,4	5,6	5,8	6,0	6,0	7	0,02 —0,0003	0,16—0,0025	0,05 —0,000 78
34	0,125	4,4	4,4	4,4	4,4	5,6	5,8	6,0	6,0	9	0,125—0,0004	1,03—0,004	0,32 —0,001
35	0,125	4,4	4,4	4,4	4,4	5,6	5,8	6,0	6,0	9	0,125—0,0004	1,03—0,004	0,32 —0,001

dauung hemmt, und daß die am stärksten konzentrierten Lösungen des Präparats den Prozeß beschleunigen. Um die Ursache des unerwarteten Effekts konzentrierter Brechweinsteinlösungen (0,125 mol.) zu erklären, haben wir folgenden Versuch angestellt: In zwei Reihen Probiergläser wurde Stärke in abnehmender Konzentration verteilt und in eine Reihe 1 ccm Brechweinstein, in die andere 1 ccm Wasser hinzugefügt. Hierbei zeigte es sich, daß 0,01 und 0,02 mol. Brechweinsteinlösungen auf die Empfindlichkeit der Reaktion von Stärke mit Jod keinen schädlichen Einfluß haben, bei 0,125 mol. Lösungen aber wird ein 0,006% Stärkegehalt durch Jod nicht mehr angezeigt, und auf diese Weise erhält man einen Effekt, welcher der Beschleunigung des Prozesses bei Vorhandensein stärkerer Lösungen des Präparats entspricht. Ferner haben wir die Konzentrationsgrenze von Brechweinstein, bei der er noch einen hemmenden Einfluß auf die Amylase ausübt, festgestellt (Tabelle III).

Der Versuch hat gezeigt, daß sich der hemmende Effekt des Brechweinsteins bis zu den Konzentrationen erstreckt, bei denen p_H 5,6 bis 6,0 erreicht. Die oben beschriebenen Versuche gestatten die Annahme, daß der hemmende Effekt des Brechweinsteins auf die Amylase von einer durch ihn hervorgerufenen Verschiebung der Reaktion des Mediums in saurer Richtung abhängt. Um völlig sicher zu gehen, haben wir die Verdauung von Stärke in Anwesenheit eines Puffers mit optimalem p_H für Amylase = 6,6 untersucht. Spezielle Versuche haben gezeigt, daß bei Anwesenheit eines Puffers eine 0,02 mol. Brechweinsteinlösung eine Reaktion der Stärke mit Jod nicht hindert, eine 0,125 mol. Brechweinsteinlösung aber eine 0,0125% Stärkelösung nicht feststellen läßt. Die Ergebnisse dieser Beobachtungen finden sich in Tabelle IV.

Diese Tabelle zeigt deutlich, daß bei Anwesenheit eines Puffers Brechweinstein das p_H des Gemenges nicht verschiebt und auf den Prozeß keinen Einfluß hat, mit Ausnahme einer scheinbaren Beschleunigung bei Anwesenheit einer 0,125 mol. Lösung des Präparats. Bei Untersuchung des Einflusses von Brechweinstein mit abnehmender Konzentration auf die Verdauung bei Anwesenheit eines Puffers mit optimalen[1]) p_H = 6,6, haben wir die in Tabelle V angeführten Resultate erhalten (Tabelle V).

Tabelle V zeigt, daß in einer Pufferlösung Brechweinstein in einer Konzentration von 0,0625 bis 0,000009 mol. weder eine hemmende noch eine beschleunigende Wirkung auf die Stärkeverdauung der Speichelamylase ausübt.

---

[1]) *J. A. Smorodinzew*, Fortschritte d. biolog. Chem. 4, 79, 1926, russisch.



Tabelle IV. Das verdaute Gemenge besteht aus 2 Teilen einer 1 ‰ Stärkelösung, aus 1 Teil Brechweinstein von angegebener Konzentration oder Wasser und 1 Teil Speichel in abnehmender Konzentration. Die Fermentverdünnung wurde mittels des *Mac Ilvain*schen Puffers mit $p_H = 6,6$ vorgenommen. Verdauungsdauer 30' bei 38°.

Nr. der Versuche	Reagens	Konzentration des Brechweinsteins mol.	Bestimmung von p_H des Gemenges im ersten Probiergläschen kolorimetrisch				Bestimmung von p_H des Gemenges im letzten Probiergläschen kolorimetrisch				Nr. des letzten farblosen Probiergläschen	Menge der Fermenteinheiten
			ohne Puffer		mit Puffer		ohne Puffer		mit Puffer			
			vor der Verdauung	nach der Verdauung	vor der Verdauung	nach der Verdauung	vor der Verdauung	nach der Verdauung	vor der Verdauung	nach der Verdauung		
36	H_2O	—	6,6	6,6	6,4	6,4	6,7	6,7	6,5	6,5	3	8
37	$C_4H_4O_6<^{K}_{SbO}$	0,01	6,6	6,6	6,4	6,4	6,6	6,6	6,4	6,4	3	8
38		0,02	6,6	6,6	6,4	6,4	6,8	6,8	6,5	6,5	3	8
39		0,125	6,4	6,4	6,4	6,4	6,6	6,6	6,3	6,3	5	32

Tabelle V. Das verdaute Gemenge besteht aus 2 Teilen einer 1 ‰ Stärkelösung, aus 1 Teil Brechweinstein in abnehmender Konzentration und 1 Teil Speichel von angegebener Konzentration. Die Verteilung des Brechweinsteins geschah mittels des *Mac Ilvain*schen Puffers mit $p_H = 6,6$. Verdauungsdauer 30' bei 38°.

Nr. der Versuche	Konzentration des Ferments	Bestimmung von p_H des Gemenges kolorimetrisch								Konzentration des Brechweinsteins			Resultat
		im ersten Probiergläschen				im letzten Probiergläschen							
		ohne Puffer		mit Puffer		ohne Puffer		mit Puffer		molar	% des Salzes im Gemenge	% von Sb im Gemenge	
		vor der Verdauung	nach der Verdauung	vor der Verdauung	nach der Verdauung	vor der Verdauung	nach der Verdauung	vor der Verdauung	nach der Verdauung				
40	1 : 100	6,6	6,6	6,4	6,4	6,6	6,4	6,6	6,6	0,005 —0,000 009 7	0,04—0,000 08	0,012—0,000 39	Alle sind verdaut
41	1 : 100	6,6	6,6	6,4	6,4	6,6	6,4	6,6	6,4	0,01 —0,000 019	0,08—0,000 16	0,025—0,000 78	
42	1 : 100	6,6	6,6	6,3	6,3	6,4	6,4	6,6	6,6	0,0625—0,000 1	0,51—0,001	0,19 —0,000 31	
43	1 : 200	6,6	6,6	6,4	6,4	6,6	6,4	6,6	6,6	0,005 —0,000 009 7	0,04—0,000 08	0,012—0,000 39	Alle unverdaut
43	1 : 200	6,6	6,6	6,4	6,4	6,6	6,4	6,6	6,4	0,01 —0,000 019	0,08—0,000 16	0,025—0,000 78	
45	1 : 200	6,6	6,6	6,3	6,3	6,4	6,4	6,6	6,6	0,0625—0,000 1	0,51—0,001	0,19 —0,000 31	

Zusammenfassung.

1. Der hemmende Effekt des Brechweinsteins auf die Amylase hängt davon ab, daß seine Lösungen eine saure Reaktion haben und daß sie das p_H des verdauten Gemenges aus den Grenzen des Optimums verschieben.

2. Im Puffermedium hat Brechweinstein auf die Verdauung von Stärke durch die Speichelamylase weder eine beschleunigende noch eine hemmende Wirkung.

3. Sowohl bei Anwesenheit eines Puffers und Brechweinsteins als auch ohne sie ändert sich das p_H des Mediums während der Stärkeverdauung nicht.

4. Die aktive Reaktion des Gemisches bei Bestimmung der Speichelamylase nach *Wohlgemuth* entspricht nicht dem Optimum ihrer Wirkung.

Über proteolytische Fermente im Serum.

VIII. Mitteilung:

Untersuchungen über die Möglichkeit einer Grundeinheit der Blutfermente.

Von

M. Frhr. v. Falkenhausen.

(Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik Breslau.)

(Eingegangen am 7. April 1927.)

Durch gemeinsame Arbeiten mit *H. J. Fuchs*[1]) gelang es, den Nachweis zu erbringen, daß das Komplement eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung spielt. In der früheren Literatur finden sich, wie wir in unserer Mitteilung eingehend dargelegt haben, bereits zahlreiche Hinweise auf Analogien zwischen Komplement- und Thrombogenwirkung. Die sich hiernach aufdrängende Frage, ob etwa das Komplement dem Serocym bzw. eine Komplementkomponente dem Proserocym *Bordets* entspricht, wird zurzeit von *Fuchs* und *Hartmann* bearbeitet. Die Möglichkeit, im Komplement bzw. einem Teile desselben eventuell das Gerinnungsferment zu identifizieren, sowie die Auffassung führender Gelehrter von der Fermentnatur des Komplements, wie z. B. *Ehrlichs*, der es geradezu als „Verdauungsferment" auffaßte, ließ den Gedanken an eine vielleicht im Komplement zu findende Grundeinheit jeglicher Fermentwirkung entstehen. In eine experimentelle Prüfung dieser Frage einzutreten, wurden wir durch die Mitteilung *Galwialos*[2]) über Isolierung eines „Grundferments" aus dem Blute bestimmt.

Galwialo stellt das „Grundferment" in der Weise her, daß er durch 10- bis 15fach verdünntes, in einer Kältemischung befindliches Oxalatplasma vom Menschen oder Pferd 10 Minuten lang Kohlensäure langsam hindurchleitet. Nach 24stündigem Stehen bei 0° sammelt sich hiernach ein zäher, weißer Niederschlag an, der nach Auswaschen mit Eiswasser und nochmaligem 24stündigen Verweilen in der Kältemischung mit Quarzsand verrieben wird Das Filtrat enthält dann das Ferment, während der Rückstand, ebenso wie die Plasmalösung, aus der der Niederschlag aus-

---

[1]) Verhandl. d. Kongr. f. inn. Med. 1927; diese Zeitschr. **184**, 172, 1927.

[2]) Diese Zeitschr. **177**, 266, 1926.

gefällt wurde, keine fermentativen Eigenschaften mehr besitzt. Es gelang nun *Galwialo*, durch jeweiligen Zusatz von Speichel-, Magensaft- und Pankreassaftelektrolyten das von ihm hergestellte „Grundferment" spezifisch als Diastase, Protease und Lipase zu aktivieren. Kontrollen mit den einzelnen Elektrolyten ohne Ferment ließen eine Verdauungswirkung vermissen.

Der Nachweis der erwähnten drei Verdauungsqualitäten war nun unseres Erachtens nicht genügend für die Annahme eines Grundferments. Von einem Grundferment des Blutes müßte man bei entsprechender Aktivierung auch noch andere Fermentwirkungen verlangen, z. B. die Fähigkeit, bei Anwesenheit von Calciumsalzen als Gerinnungsferment zu wirken. Eine Identifizierung des Galwialoferments mit dem Gerinnungsferment versprach immerhin eine weitere Stütze für die Auffassung der Grundfermentnatur. Die Prüfung dieser Frage schien uns erfolgversprechend, da die von *Galwialo* geübte Technik der Fermentisolierung große Ähnlichkeit mit einer von *Braun*[1]) angegebenen Methodik der Isolierung des Komplementmittelstücks aufweist, dessen hypothetische Beziehung zum Proserocym bereits angedeutet wurde. Die beiden Methoden unterscheiden sich im Grunde genommen nur dadurch, daß *Braun* den in gleicher Weise gewonnenen Niederschlag unverzüglich abzentrifugiert, in physiologischer Kochsalzlösung auflöst und sofortige Verwendung empfiehlt, während *Galwialo* ein zweitägiges Verweilen des Niederschlags bei Kälte und Verreiben desselben in Quarzsand bei Zugabe von Kohlensäurewasser fordert.

Wir stellten uns nun zunächst die Aufgabe, das nach *Galwialos* Angaben hergestellte Ferment auf diastatische, proteolytische, lipolytische, thrombogene und komplementäre Eigenschaften zu untersuchen. Soweit es sich hierbei um eine Nachprüfung der drei erstgenannten Qualitäten handelte, haben wir uns bei den Mengenverhältnissen und dem p_H der verwendeten Lösung von Ferment und Elektrolyten streng an die Vorschriften von *Galwialo* gehalten. Im übrigen haben wir die Untersuchungen teils vereinfacht, teils eine empfindlichere Methodik verwendet.

Zur Feststellung der *Diastase*wirkung ermittelten wir die aus Stärke entstandene Glykosemenge nach *Hagedorn-Jensen*. Da aber nur gröbere Differenzen zu gültigen Schlüssen berechtigen, so erwies sich in der Folge zumeist die Prüfung des Stärkeabbaues mittels Jodfärbung als ausreichend. Im Zweifelsfalle ließ sich der Farbprüfung noch immer die genaue quantitative Bestimmung anschließen.

Der Grad der *Proteolyse* wurde nicht, wie von *Galwialo*, nach der Menge des aus Fibrin abgespaltenen Amido-N bestimmt, da die verwendete Methode von *Sörensen* nach unseren Erfahrungen nicht voll befriedigende Resultate liefert. Wir ermittelten vielmehr die Zunahme an Gesamt-N im Mikrokjeldahlverfahren nach Einwirkung des Ferments auf pulverisiertes, getrocknetes Pferdefibrin; das unverdaute Fibrin wurde vor der Bestimmung durch Filtration entfernt. Auch hier erwies

[1]) Diese Zeitschr. 31, 65, 1911.

sich in der Folge die grob sichtbare Resultate liefernde Prüfung mittels einer Carminfibrinflocke im allgemeinen als ausreichend.

Zum Nachweis der *Lipolyse* benutzten wir nach *Rona* und *Michaelis*[1]) eine gesättigte, wässerige Tributyrinlösung, deren Veränderung stalagmometrisch (Stalagmometer nach *H. J. Fuchs*) gemessen wurde.

Nachstehend geben wir das Protokoll eines von mehreren im Resultat gleichartigen Versuchen wieder. Das Ferment wurde aus Menschenblut von normalem Komplementgehalt gewonnen. Es wurde, wo nicht besonders vermerkt, auf das jeweils im Tabellenkopf angegebene, von *Galwilao* geforderte p_H gebracht, ebenso in den Kontrollen das dafür eintretende Aqua dest. Die Elektrolytlösungen wurden entsprechend den Vorschriften *Galwialos* durch Veraschung der vom Menschen gewonnenen Säfte und Aufnahme der Asche in Aqua dest. hergestellt.

Tabelle I. Als Diastase.

p_H der Fermentlösung = 8,3.

I. 1 ccm Fermentlösung + 1 ccm Aqua dest.
II. 1 ccm Fermentlösung + 1 ccm Speichelelektrolytlösung.
III. 1 ccm Aqua dest. + 1 ccm Speichelelektrolytlösung.
IV. 1 ccm Aqua dest + 1 ccm Aqua dest.
V. 1 ccm Fermentlösung (ohne Einstellung auf obiges p_H) + 1 ccm Aqua dest.

Zu I bis V je 1 ccm 0,5% Stärkelösung.

Sofort entnommene Proben zeigten bei I bis V, mit 1 Tropfen *Lugol*scher Lösung versetzt, tiefblaue Färbung. Nach 16stündigem Verweilen im Brutschrank bei Körpertemperatur zeigten sich folgende Farbreaktionen:

I. violett, II. rot, III. blau, IV. blau, V. blau.

Die quantitative Glykosebestimmung der Gemische ergab folgende Werte:

I. 0,123%, II. 0,139%, III. 0,004%, IV. 0,004%, V. 0,004%.

Tabelle II. Als Protease.

p_H der Fermentlösung = 8,3,
p_H der Elektrolytlösung = 0,8.

I. 2 ccm Fermentlösung + 5 ccm Aqua dest.
II. 2 ccm Fermentlösung + 5 ccm Magensaftelektrolytlösung.
III. 2 ccm Aqua dest. + 5 ccm Magensaftelektrolytlösung.
IV. 2 ccm Fermentlösung (ohne Einstellung auf obiges p_H) + 5 ccm Aqua dest.

I bis IV wurde in zwei Reihen angesetzt; es wurde hinzugefügt zu Reihe a) je eine Flocke Carminfibrin, Reihe b) je eine Spur pulverisiertes, getrocknetes Pferdefibrin.

[1]) Diese Zeitschr. **81**, 345, 1911; *Rona*, Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. 1915, S. 302.



Bei Reihe b) ergab die sofort vorgenommene Stickstoffbestimmung nach Filtration bei:

I. 25,935 mg-%, II. 24,255 mg-%, III. 0,210 mg-%, IV. 27,405 mg-%.

Nach 16stündigem Verweilen im Brutschrank bei Körpertemperatur zeigte sich bei Reihe a):

I. Carminfibrin *völlig* aufgelöst.

II. bis IV. Carminfibrin *nicht* aufgelöst.

Bei Reihe b) ergaben sich nach Filtration folgende Stickstoffwerte:

I. 78,750 mg-%, II. 48,510 mg-%, III. 1,095 mg-%, IV. 34,965 mg-%.

Die Stickstoffvermehrung ist demnach folgende:

I. 52,815 mg-%, II. 24,255 mg-%, III. 0,885 mg-%, IV. 7,560 mg-%.

Tabelle III. Als Lipase.

p_H der Fermentlösung = 8,5.

Tropfenzahl der gesättigten Tributyrinlösung . . . 182,
Tropfenzahl des Aqua dest. . . . . 114.

I. 2 ccm Fermentlösung + 2 ccm Aqua dest.
II. 2 ccm Fermentlösung + 2 ccm Duodenalsaftelektrolytlösung.
III. 2 ccm Aqua dest. + 2 ccm Duodenalsaftelektrolytlösung.
IV. 2 ccm Aqua dest. + 2 ccm Aqua dest.
V. 2 ccm Fermentlösung (ohne Einstellung auf obiges p_H) + 2 ccm Aqua dest.

Zu I bis V je 50 ccm gesättigter Tributyrinlösung. Die Tropfenzählung ergab bei I bis V unmittelbar nach dem Ansatz die Zahl 180.

Nach 16stündigem Verweilen in fest verkorkten Flaschen im Brutschrank bei Körpertemperatur wurde folgende Tropfenmenge gezählt:

I. 145, II. 136, III. 167, IV. 168, V. 167.

Die auf vorstehenden Tabellen wiedergegebenen Resultate sagen folgendes aus:

Wenn wir zunächst den Diastaseversuch betrachten, so ist schon an der roten Farbreaktion bei II erkennbar, daß hier, wo Ferment mit Speichelelektrolyt gleichzeitig vorhanden war, die stärkste amylolytische Wirkung stattgefunden hat. Diese Tatsache findet auch im Ergebnis der Glykosebestimmung nach *Hagedorn* ihren zahlenmäßigen Ausdruck. Die Kontrollen III bis V zeigen keine Amylolyse. So ist also auch das Ferment ohne jeden Elektrolytzusatz wirkungslos, was den alten *Biedermann*schen[1]) Erfahrungen entspricht. Hingegen wird eine solche bei I, wo das Ferment ohne Speichelelektrolyten sich in unspezifischem, alkalischem Milieu befindet, durch eine violette Farbreaktion verraten. Diese sowohl wie auch das Resultat der quantitativen Bestimmung, läßt andererseits erkennen, daß der Grad der Amylolyse geringer ist als bei der Anwesenheit des spezifischen Elektrolyten. Bei parallelen Versuchsreihen mit gleichartigen Fermentlösungen war die Differenz

[1]) Fermentforsch. 4.

zuweilen größer, zuweilen auch kleiner. Sofern aber eine starke Aktivität des Ferments nicht nach der Versuchsdauer schon in beiden Fällen zur völligen Amylolyse geführt und auf diese Weise eine Differenz ausgeglichen hatte, war eine solche mehr oder weniger stets erkennbar. *Galwialo* selbst gibt in seinen Protokollen stets nur eine Kontrolle mit alleiniger Einwirkung der Elektrolyten wieder, die entsprechend unseren Befunden keine nennenswerte Amylolyse anzeigt. Die Erweiterung der Kontrollen zeigt also ergänzend, daß die Fermentlösung auch im unspezifischen, alkalischen Milieu schon diastatisch wirkt, jedoch durch die spezifischen Speichelelektrolyten eine Verstärkung ihrer Wirkung erfährt.

Von einschneidender Bedeutung ist die Anstellung der erweiterten Kontrollversuche bei der Prüfung der Fermentlösung auf proteolytische Eigenschaften. Hier zeigt sich schon in der Versuchsreihe a), daß das Ferment im alkalischen Milieu weitaus am stärksten wirkt; denn nur bei Ia findet sich völlige Verdauung des Carminfibrins. Ob in den anderen Kombinationen überhaupt eine Verdauungswirkung stattgefunden hat, ist aus Reihe a) nicht ersichtlich; doch weist dies die quantitative Stickstoffbestimmung bei Reihe b) nach. Aus derselben ist zu entnehmen, daß das Ferment ohne jeden Elektrolytzusatz (IV) nur geringfügig gewirkt hat. Vielleicht sind in dem Fibrin trotz langdauernder Waschung vor der Trocknung doch noch minimale Elektrolytspuren zurückgeblieben, die die geringe Wirkung ermöglichten. Die Fermentlösung, mit den spezifischen Magensaftelektrolyten vereint, also im sauren Milieu, zeigt zwar proteolytische Wirkung, doch erreicht sie quantitativ noch nicht ganz die Hälfte ihrer Wirkung im alkalischen Milieu.

Da das p_H bei jeglicher Fermentwirkung von entscheidender Bedeutung ist, so wurde an die Möglichkeit gedacht, daß in dem benutzten p_H der Elektrolytlösung vielleicht doch nicht das Wirkungsoptimum gegeben sei. Wir setzten daher den auf Tabelle IV wiedergegebenen Versuch mit absteigendem Säurezusatz an.

Tabelle IV.

2 ccm Fermentlösung (p_H = 8,3) + 5 ccm Magensaftelektrolytlösung (ohne Einstellung auf ein bestimmtes p_H) + 1 Flocke Carminfibrin.

I.	1	ccm	Aqua dest.
II.	1	„	2% HCl.
III.	1	„	1% HCl.
IV.	1	„	0,5% HCl.
V.	1	„	0,25% HCl.

Nach 16stündigem Verweilen im Brutschrank bei Körpertemperatur war nur bei der alkalischen Kontrolle I das Carminfibrin völlig verdaut.

Bei II bis IV blieb die Flüssigkeit völlig farblos; bei V, also beim geringsten Säuregehalt, war eine *leichte* Rötung der Flüssigkeit vorhanden. Offenbar ist demnach in keinem sauren Milieu die Stärke der Proteolyse bei alkalischem Milieu zu überbieten.

Die lipolytischen Fähigkeiten der Fermentlösung sind im wesentlichen analog den diastatischen. Bei der Empfindlichkeit des Tributyrins sind nach der langen Versuchsdauer geringe Zersetzungserscheinungen auch bei den Kontrollen zu finden. Sie sind aber ohne Belang, da die Ausschläge bei vorhandener Fermentwirkung erheblich sind. Auch hier ist die Fermentwirkung bei Anwesenheit der spezifischen Elektrolyten stärker als im unspezifischen, alkalischen Milieu, doch sind die Differenzen hier meist äußerst geringfügig.

Aus dem Vorstehenden ergibt sich nun zunächst nichts weiter, als daß die nach *Galwialo* hergestellte Fermentlösung tatsächlich diastatische, proteolytische und lipolytische Qualitäten hat, und daß diese, abgesehen von der proteolytischen, durch Zusatz spezifischer Elektrolyten verstärkt werden können. Hiermit ist jedoch der Beweis, daß es sich um ein Grundferment handelt, keineswegs erbracht; denn es ist lange bekannt, daß die erwähnten drei Fermente an sich im Blute vorhanden sind. Bei der von *Galwialo* geübten Methodik könnte es sich also auch nur um die technische Isolierung eines Gemisches der drei Verdauungsfermente des Blutes handeln. Daß gewisse, nicht aus dem Blute stammende Elektrolyte einen fördernden Einfluß ausüben können, ist auch nichts Auffallendes. So verstärkt z. B. Rhodankalium auch die amylolytische Kraft der Leber- und Pankreasdiastase [*Bittorf* und *v. Falkenhausen*[1])], obwohl nach seinem physiologischen Vorkommen nur Beziehungen zur Speicheldiastase in Betracht zu kommen scheinen.

Wie eingangs erwähnt, ist zur Stützung der Annahme einer Grundfermentnatur der Nachweis weiterer fermentativer Qualitäten der in Rede stehenden Fermentlösung erforderlich. Wir gingen daher zur Prüfung derselben auf ihre Eigenschaft als Gerinnungsferment über. Zu diesem Zwecke wurde mittels Tricalciumphosphat nach *Bordet* Oxalatplasma proserocymfrei gemacht. Hiernach wurde das Plasma recalcifiziert (5 ccm Plasma + 2 ccm n/10 $CaCl_2$). Von dem so behandelten Plasma wurde je 1 ccm angesetzt mit:

I. 1 ccm Fermentlösung (*Galwialo*).
II. 1 „ Restflüssigkeit nach Ausfällung des Fermentniederschlags.
III. 1 „ 0,85 % NaCl-Lösung.

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **115**, 1926.

Nach 12 Stunden zeigte sich:

I. Einwandfreie, aber nicht ganz vollständige Gerinnung.
II. Keine Spur von Gerinnung.
III. „ „ „ „

Die Anwesenheit von Gerinnungsferment in der Fermentlösung war hiernach nicht zu bezweifeln; doch war die Wirkung, wie gesagt, nicht stark. In Anbetracht der gemeinsam mit *Fuchs* beobachteten Beziehungen von Komplement und Blutgerinnung untersuchten wir nun noch die komplementären Eigenschaften der Fermentlösung. Unter Berücksichtigung der schon erwähnten, dem Galwialoverfahren ähnlichen *Braun*schen Angabe zur Trennung von Mittel- und Endstück des Komplements setzten wir den auf folgender Tabelle V wiedergegebenen Versuch an:

Tabelle V.

A. Galwialofermentlösung (1 : 1 mit 1,7% NaCl-Lösung).
B. Restflüssigkeit nach Absetzen (1 : 1 mit 1,7% NaCl-Lösung).
C. A + B zu gleichen Teilen.

	A	B	C
0,5	0	0	Sp.
0,25	0	0	Spch.
0,15	0	0	0
0,0	0	0	0

mit 0,85% NaCl-Lösung auf 0,5 ergänzt, + 0,5 HaAz 2 Stunden bei 39°.

Die Komplementwirkung ist also recht geringfügig. Sie zeigt sich nur bei Anwesenheit von A + B, woraus also erhellt, daß die Trennung der Komplementkomponenten auch bei dem Galwialoverfahren eintritt. Mit demselben ist aber offenbar eine noch stärkere Schwächung des Komplements als sie schon bei der Trennung nach *Braun* eintritt, verknüpft. Mitunter war Hämolyse überhaupt nicht nachweisbar; völlig komplette Hämolyse wurde überhaupt nicht erzielt. Auch bei fehlender Hämolysewirkung ließ sich jedoch eine, wenn auch sehr geringe und erst nach vielen Stunden bemerkbare Proserocymwirkung der Fermentlösung feststellen. Offenbar genügt hierbei schon die Anwesenheit von minimalsten Spuren von Komplementmittelstück, die im Hämolyseversuch nicht manifest zu werden vermögen. *In diesen Beobachtungen liegt ein Hinweis auf die Identität von Komplementmittelstück und Proserocym.*

Wir prüften weiterhin noch nach *Braun* hergestellte Niederschlagslösung auf die Eigenschaften der Verdauungsfermente. Die Wirkung war zwar erkennbar, aber äußerst gering. Ferner stellten wir aus Meerschweinchenblut, das ja als besonders komplementreich bekannt ist, eine Fermentlösung nach *Galwialo* her. Sie unterschied sich jedoch in

ihrer Wirkung nicht im geringsten von einer aus Menschenblut gewonnenen Lösung. Aus allen diesen Untersuchungen ließ sich also ein weiterer Anhaltspunkt für die Annahme eines Grundferments des Blutes nicht gewinnen. Die nur geringe gerinnungsfermentative Wirkung der Lösung schien eher dagegen zu sprechen. Die demnach nur geringe Wahrscheinlichkeit einer im Komplement bzw. einem Teile desselben zu erblickenden Grundeinheit jeglicher Fermentwirkung durfte von folgendem Versuch Klärung erwarten: Das Komplement wird bei halbstündiger Erhitzung auf 56° zerstört. Wenn also die Verdauungswirkung der Fermentlösung die Anwesenheit intakten Komplements zur Voraussetzung hatte, so mußte sie mit der Zerstörung des Komplements gleichfalls verschwinden. Es wurde daher von einem ½ Stunde auf 56° erhitzten Oxalatplasma in der üblichen Weise eine Fermentlösung, die keine Gerinnungsfermentwirkung mehr aufwies, hergestellt und diese auf diastatische, proteolytische und lipolytische Fähigkeiten geprüft. Es zeigte sich, daß die erste und letzte Qualität vorhanden war, während eine Verdauung von Carminfibrin durch dieses Ferment im alkalischen Milieu nicht wahrgenommen wurde. Durch diesen Versuch erwies sich einerseits die Unabhängigkeit der diastatischen und lipolytischen Wirkung von der Anwesenheit intakten Komplements bzw. der thermolabilen Komponente (Mittelstück) desselben. Ferner sprach das Fehlen der Proteasenwirkung, die bei der besonders starken Empfindlichkeit der Proteasen gegen Temperaturerhöhungen nicht wundernimmt, trotz Erhaltensein der Diastasen- und Lipasenwirkung zum mindesten nicht für die Wahrscheinlichkeit eines Grundferments.

Wir unterwarfen weiterhin eine nach *Galwialo* gewonnene Fermentlösung halbstündiger fraktionierter Erhitzung und prüften dann die einzelnen Fraktionen in der üblichen Weise auf ihre Fermentwirkung.

Tabelle VI zeigt das Resultat.

Tabelle VI.

Ferment als:

	1. Diastase (Jodfarbreaktion) nach 16 Std.	2. Protease (Carminfibrin) nach 16 Stunden	3. Lipase (Tropfenzahl nach Ansetzen 182) nach 16 Stunden
0-Kontrolle unerhitzt	blau	intakt	176
Ferment unerhitzt	farblos	völlig gelöst	152
bei 60°	„	teilweise gelöst	156
„ 70	„	intakt	158
„ 80	rötlich	„	159
„ 90	rot	„	159
„ 100	blau	„	169

Ein Vergleich der Resistenz der drei Fermentqualitäten zeigt völlige Ungleichmäßigkeit. Die größte Empfindlichkeit zeigt auch

hier die proteolytische Wirkung; sie ist bei 60° schon geschwächt, bei 70° geschwunden. Die sichtbare Schwächung der Diastase beginnt erst bei 80°. Am resistentesten ist die lipolytische Fähigkeit der Fermentlösung. Eine starke Schwächung ist hier erst bei 100° festzustellen, wenngleich sie bei niedrigeren Graden schon erkennbar ist. Die Inaktivierungstemperaturen stimmen nicht völlig mit den für die Fermente des Blutes angegebenen überein; hierfür dürfte die Milieuänderung, die bei jeglicher Fermentwirkung eine entscheidende Rolle spielt, verantwortlich zu machen sein. Die groben Differenzen in den Inaktivierungstemperaturen sind jedenfalls nicht geeignet, die Annahme eines Grundferments im Blute zu stützen. Als ganz strikter Gegenbeweis dürfen sie freilich andererseits auch nicht angesehen werden; denn es ist theoretisch denkbar, daß auch ein Grundferment nicht in allen Qualitäten beim gleichen Hitzegrad vernichtet wird, sondern nur gewisse Eigenschaften bei verschiedenen Hitzegraden verliert, ohne in seiner Gesamtheit zerstört zu werden. Der Beweis, daß das von *Galwialo* hergestellte Substrat den Namen eines „Grundferments" mit Recht trägt, ist immerhin in keiner Weise erbracht. Wir stimmen zwar durchaus mit *Galwialo* überein in den Bedenken, ob nicht die immer wieder durch die Beschreibung neuer vermehrte Zahl von Fermenten zu groß ist. Trotzdem muß man in diesem Falle doch sagen, daß es das Nächstliegende ist, das nach *Galwialo* gewonnene Substrat als ein Gemisch der bekannten im Blute enthaltenen Fermente anzusehen, deren Wirkung sich durch den Zusatz bestimmter Elektrolyte verstärken läßt.

Zusammenfassung.

1. Die aus Blut nach *Galwialo* gewonnene Fermentlösung zeigt auch bei Prüfung mit veränderter Methodik diastatische, proteolytische und lipolytische Fähigkeiten.

2. Diese Fermentwirkungen finden durchweg schon im unspezifischen alkalischen Milieu statt.

3. Die diastatische und lipolytische Wirkung läßt sich durch gleichzeitige Anwesenheit von Speichel- bzw. Duodenalsaftelektrolyten verstärken. Die proteolytische Wirkung ist jedoch im alkalischen Milieu etwa doppelt so stark, wie im sauren, d. h. bei Anwesenheit von Magensaftelektrolyten.

4. Die Fermentlösung *Galwialos* zeigt meist geringe Komplementmittelstückwirkung im Hämolyseversuch und entsprechende Proserocymwirkung, worin ein Hinweis auf eine Identität von Komplementmittelstück und Proserocym erblickt werden darf.

5. Zum Komplement bzw. dessen thermolabiler Komponente (Mittelstück) stehen die Verdauungsfermentwirkungen der *Galwialo*-

Lösung offenbar nicht in Beziehung, da die diastatische und lipolytische Fähigkeit einer nach *Galwialo* aus Oxalatplasma, welches ½ Stunde auf 56⁰ erhitzt wurde, gewonnenen Fermentlösung erhalten bleibt; die proteolytische geht dabei verloren.

6. Bei fraktionierter Erhitzung der Fermentlösung schwinden die einzelnen Fermentqualitäten nicht beim gleichen Hitzegrad.

7. Das Vorliegen *eines* ,,Grundferments" des Blutes ist hiermit zwar nicht sicher widerlegt; doch ist die Annahme eines solchen als vollkommen unbewiesen anzusehen. Wahrscheinlich handelt es sich bei der *Galwialo*-Lösung um ein isoliertes Gemisch der bekannten verschiedenen Blutfermente.

Die Untersuchungen wurden zum Teil in den Räumen der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität ausgeführt. Ihrem Leiter, Herrn Prof. *E. Schmitz*, sage ich für die gütige Erteilung seiner Erlaubnis meinen ergebensten Dank.

Eine neue spezifische Farbreaktion auf Magnesium und eine einfache kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Spuren dieses Elements.

Von

J. M. Kolthoff.

(Mitteilung aus dem Pharmazeutischen Laboratorium der Reichsuniversität Utrecht.)

(Eingegangen am 9. April 1927.)

In der Preisliste der „British Drug Houses", London, wird unter anderem der Säure-Base-Indikator „Titan-yellow" genannt, welche Substanz der dortigen Angabe nach ein Umwandlungsintervall zwischen p_H 12 bis 13 hat[1]). Bei einer angestellten Untersuchung ergab sich, daß dies angenähert zutrifft. Der Indikator ist wasserlöslich; als Vorratlösung verwendete ich 0,1 g Indikator auf 100 ccm Wasser (0,1 %). Fügt man 0,2 ccm dieser Lösung zu 4 bis 5 ccm Flüssigkeit, so ist die Farbe rein gelb, wenn die Wasserstoffionenkonzentration größer ist als in 0,01 n Natronlauge (p_H etwa 12), in 0,025 n NaOH weicht die Farbe etwas nach der braunen Seite ab, in 0,05 n NaOH ist sie etwas dunkelbraun und in 0,1 n NaOH schwach orangebraun. Erhöht man die Hydroxylionenkonzentration, so nimmt die Farbtiefe wieder etwas ab, und in n Natronlauge ist die Farbe orangegelb.

Als Säure-Baseindikator hat die Substanz nur eine geringe praktische Bedeutung, dagegen ergab sich bei meinen Versuchen, daß man damit auch die *geringsten Spuren Magnesium* einfach nachweisen bzw. bestimmen kann. Weil Magnesium biologisch auch eine große Bedeutung hat, werden wir unten die Einzelheiten ausführlich beschreiben. Nach *Ullmanns* Enzyklopädie der technischen Chemie (*2*, 64, 1915) ist Titangelb „Acridingelb 5 G", gebildet aus 2 Molekülen Dihydrothio-p-toluidinsulfosäure

S C SO_3Na N = N H N— SO_3Na S —C CH_3 N N

---

[1]) *Bemerkung bei der Korrektur.* Dr. *G. Grübler*, Leipzig, liefert ein „Titangelb A", das dieselben Eigenschaften wie das „Titan-yellow" hat.

Es ist ein gelbbraunes Pulver, das in Wasser und Alkohol löslich ist. Titangelb gehört zu den substantiven Farbstoffen. Es zeigte sich nun, daß, wenn Magnesiumhydroxyd bei Anwesenheit von Titangelb gefällt wird, der Farbstoff an der Oberfläche des Hydroxyds in dunkelroter Form festgelegt wird. Das Titangelb verhält sich also als „Adsorptionsindikator“[1]). Fügt man zu einer Lösung ein wenig Titangelb und macht darauf mit Natronlauge alkalisch, so schlägt die *gelbe Farbe in Ziegelrot um, wenn Magnesium vorhanden ist.* Man kann die Reaktion sowohl bei kleiner wie großer Alkalität ausführen.

a) Fügt man zu 10 ccm Lösung 0,5 ccm 0,1 % Indikator und 1 ccm 0,1 n Natronlauge, so bleibt die Flüssigkeit rein gelb, wenn kein Magnesium vorliegt. Enthält die Lösung 50 mg Mg im Liter, so wird sie ziegelrot, beim Stehen wird das Hydroxyd in dunkelroten Flocken ausgefällt; die überstehende Lösung ist farblos. Eine Flüssigkeit mit 20 mg Mg im Liter verhält sich einigermaßen ähnlich, mit 10 mg Mg im Liter wird die Farbe schön rotbraun, jedoch flockt das Magnesiumhydroxyd nicht mehr aus. Enthält die Lösung 5 mg Mg im Liter, so wird sie noch rotbraun, mit 2 mg Mg im Liter orangebraun; Grenzempfindlichkeit 1 mg Mg im Liter.

b) Empfindlicher wird die Reaktion noch bei größerer Alkalität. *Vorschrift*: Zu 10 ccm Flüssigkeit fügt man 0,2 ccm 0,1 % Indikatorlösung und 0,25 bis 0,5 ccm 4 n Natronlauge. Eine Lösung, welche magnesiumfrei ist, nimmt dann eine gelbbraune Farbe an. Enthält sie 5 mg Mg im Liter, so wird die Flüssigkeit schön rot gefärbt, mit 2 mg Mg im Liter orangerosa; 1 mg Mg im Liter orange. Vergleicht man neben einem blinden Versuch, so geht die *Empfindlichkeit* bis 0,2 mg Mg im Liter. Diese ist wohl die empfindlichste Reaktion auf Magnesium, die wir besitzen.

Sehr eigenartig ist, daß Spuren Calcium die Intensität der roten Farbe vergrößern. So wiederholte ich alle Versuche bei Anwesenheit von 100 mg Calcium im Liter. Der blinde Versuch ergab dieselbe Farbe wie in calciumfreier Lösung, dagegen war die Farbe in den magnesiumhaltigen Flüssigkeiten etwa zweimal stärker geworden. Eine Lösung mit 2 mg Mg im Liter wird dann noch schön rosa gefärbt. Die farbvertiefende Wirkung des Calciums ist fast von der Konzentration dieses Elements unabhängig, wenn sie zwischen 20 und 200 mg Ca im Liter liegt. Ist mehr Calcium vorhanden, so tritt bald eine Ausscheidung von Calciumcarbonat auf, das den Farbstoff auch adsorbieren kann. Bei Abwesenheit von Magnesium ist der Niederschlag jedoch braun gefärbt, ist auch nur eine Spur Magnesium vorhanden, so wird der

---

[1]) Für eine Übersicht und die Literatur über Adsorptionsindikatoren vgl. *J. M. Kolthoff*, Die Maßanalyse 1, 104. Berlin, Verlag Julius Springer, 1927.

Niederschlag rot gefärbt. Außer Calcium hat auch Barium die Eigenschaft, die rote Farbe zu vertiefen; Strontium dagegen hat einen geringeren Einfluß.

Die beschriebene Reaktion ist auch für eine schnelle kolorimetrische Gehaltsbestimmung des Magnesiums sehr geeignet.

Von praktischer Bedeutung ist dies unter anderem bei der Trinkwasseruntersuchung. Trinkwasser enthält gewöhnlich nur Spuren Magnesium und eine direkte, einfache Bestimmung dieses Elements neben den anderen Bestandteilen haben wir nicht. Die kolorimetrische Bestimmung geschieht am besten bei Konzentrationen zwischen 4 und 0,2 mg Mg im Liter. Enthält die zu untersuchende Lösung auch Calcium (wie es bei Gebrauchswasser der Fall ist), so ist es nötig, Vergleichslösungen herzustellen, welche neben Magnesium etwa 50 bis 100 mg Calcium im Liter enthalten. Enthält die zu untersuchende Lösung so viel Calcium, daß es als Calciumcarbonat gefällt wird, so ist es nötig, die Flüssigkeit zweckmäßig zu verdünnen. Die Ausführung der Bestimmung geschieht in derselben Weise, wie bei der qualitativen Reaktion beschrieben ist. Man fügt zu 10 ccm Lösung 0,2 ccm 0,1 % Indikator und 0,25 bis 0,5 ccm 4 n Natronlauge, und beurteilt die Farbe neben Vergleichslösungen von Magnesium in calciumhaltigem destillierten Wasser. In dieser Weise fand ich, daß das Utrechtsche Leitungswasser 3,4 mg Mg im Liter enthält, während nach den offiziellen Methoden (gewichtsanalytisch) ein Gehalt von 3,6 mg Mg im Liter gefunden ist. (Statistiek Overzicht der Waterleidingen in Nederland over 1924 en 1925.) Die Übereinstimmung ist also sehr schön, und es ist zu erwarten, daß diese kolorimetrische Magnesiumbestimmung neben der Ermittlung der totalen Härte von praktischem Interesse sein wird.

Ob die gegebene Vorschrift am zweckmäßigsten ist, wird sich erst ergeben, wenn man sie in den verschiedenen, praktisch vorkommenden Fällen systematisch geprüft hat.

Die beschriebene Reaktion ist auch sehr geeignet zur Prüfung von Alkalisalzen auf die Anwesenheit von Magnesium bzw. zur kolorimetrischen Ermittlung des Magnesiumgehalts. Bei der Untersuchung eines Präparats Natriumchlorid, das als Ursubstanz verwendet wird, ergab sich, daß eine Lösung von 0,5 g Salz auf 10 ccm Wasser keine Reaktion auf Magnesium ergab. Dagegen gab eine andere Zubereitung Natriumchlorid „pro analysi" eine sehr deutliche Reaktion (etwa 0,005 % Magnesium). Auch für die Untersuchung von Natrium- und Kaliumsulfat, -nitrat, -oxalat, -acetat usw. ist die Reaktion sehr geeignet.

Bei der Prüfung von Borax muß man mehr Natronlauge hinzufügen, weil der Borax selbst noch 2 Äquivalente Base binden kann. Daher

führte ich die Reaktion in folgender Weise aus: Zu 10 ccm Lösung von 0,5 g Borax in 10 ccm Wasser fügt man 0,2 ccm Indikator und 2 ccm 4 n Natronlauge. Ein Präparat Borax, das dreimal aus Wasser umkristallisiert war, ergab in dieser Weise eine negative Reaktion auf Magnesium; eine Zubereitung von *Kahlbaum* enthielt jedoch eine Spur Magnesium, etwa 0,002 % entsprechend. In Handelspräparaten von Lithiumsalzen kann man mit der beschriebenen Reaktion Magnesium leicht nachweisen. Auch in Calciumsalzen ist dies möglich, wenn man die Farbe der entstehenden Fällung beurteilt. Ist diese braun, so ist Magnesium abwesend; eine rosa bis rote Farbe weist auf die Anwesenheit dieses Elements.

Eigenartig ist, daß *Aluminiumsalze, auch wenn sie nur in kleinen Mengen vorhanden sind, die Reaktion stark stören.* Man muß das Aluminium daher entfernen, bevor man die Reaktion auf Magnesium ausführt. Entfernt man das Aluminium in der üblichen Weise mit Ammoniak, so ergibt sich, daß das Aluminiumoxydhydrat das Magnesium sehr stark adsorbiert. Ebenso, wie bei der Boraxprüfung beschrieben ist, muß man hier zum Filtrat einen großen Überschuß Natronlauge hinzufügen, um die Ammoniumsalze unschädlich zu machen. Aus einer Lösung, welche auf 10 ccm 50 mg Aluminium und 0,1 mg Magnesium enthielt, wurde das Aluminium in der Siedehitze mit Ammoniak gefällt; zum Filtrat wurde Indikator und ein Überschuß Natronlauge gefügt. Es ergab sich, daß etwa 90 % des Magnesiums adsorbiert war.

Auch *Zinksalze* stören die Reaktion auf Magnesium sehr stark, sogar geringe Mengen haben noch einen merkbaren Einfluß. Das Zink ist einfach unschädlich zu machen, indem man einen Überschuß Natriumsulfid hinzufügt. So fügte ich zu 10 ccm einer Zinklösung, welche 50 mg Zink enthielt, 0,2 ccm Indikator, einen Überschuß Natriumsulfid und darauf 1 ccm 4 n Natronlauge. Der Niederschlag war schwach orangebraun. War zudem 0,1 mg Magnesium vorhanden, so färbte der Niederschlag sich schön rosarot.

Cadmiumsalze geben bei der Fällung mit Natronlauge bei Anwesenheit des Indikators einen braungefärbten Niederschlag. Enthält die Lösung dagegen auch Magnesium, so ist der Niederschlag rosa bis rot gefärbt. In dieser Weise ist in Handelspräparaten von Cadmiumchlorid die Anwesenheit von Magnesium nachweisbar. *Zinn* stört gleichfalls wie Aluminium die Reaktion auf Magnesium und muß daher entfernt werden.

Schließlich sei noch bemerkt, daß ich versucht habe, Magnesiumsalze direkt mit Natronlauge auf Titangelb zu titrieren. Es ergab sich jedoch, daß der Niederschlag schon im Anfang der Titration rot gefärbt

wird. Wahrscheinlich wird das Magnesiumhydroxyd in der schwach alkalischen Flüssigkeit schon negativ geladen, auch wenn noch ein Überschuß von Magnesiumionen in der Lösung vorhanden ist.

Zusammenfassung.

1. Titangelb ist ein spezifisches Reagens auf Magnesium. Zu 10 ccm Flüssigkeit fügt man 0,2 ccm 0,1 % Indikatorlösung und 0,25 bis 0,5 ccm 4 n Natronlauge. Bei Anwesenheit von Magnesium ändert die gelbe Farbe sich in Rot bzw. Orangerot. Empfindlichkeit bis 0,2 mg Mg im Liter.

2. Calciumsalze verstärken die Farbtiefe.

3. Die Reaktion ist für die kolorimetrische Bestimmung des Magnesiums sehr geeignet (4 bis 0,4 mg Mg im Liter). Enthält die zu untersuchende Lösung Calciumsalze, so macht man die Vergleichslösungen in Wasser, das etwa 100 mg Ca im Liter enthält.

4. Aluminium und Zinn stören und müssen entfernt werden. Zink kann durch Zusatz eines Überschusses Natriumsulfid unschädlich gemacht werden.

Zur Frage der analytischen Verwendbarkeit der Kohlenstoffbestimmung auf nassem Wege in organischen Substanzen.

II. Mitteilung:

Bestimmung von Chlor, Brom, Jod und Stickstoff neben Kohlenstoff in organischen Substanzen auf nassem Wege.

Von

B. Lustig.

(Aus dem Pathologisch-chemischen Laboratorium Rudolfspital, Wien.)

(Eingegangen am 9. April 1927.)

In einer vorhergehenden Arbeit[1]) zeigten wir, daß der Kohlenstoff der organischen Substanzen auf nassem Wege durch Oxydation mit Permanganat in 1 bis 3 Stunden bestimmbar ist, wobei die relativ einfache Apparatur fast keinerlei Aufsicht bedarf. Nicht bestimmbar sind nur solche organische Substanzen, die bei gewöhnlicher Temperatur sehr flüchtig sind, z. B. Campher, oder Substanzen, die mit dem Wasserdampf flüchtig, im Wasser unlöslich sind und im Kühler hängen bleiben, wie z. B. Stearinsäure. Die Verbrennungen werden entweder mit einer 1% schwefelsauren Permanganatlösung in Gegenwart von Platin als Katalysator, oder mit einer 8% H_2SO_4- und 6% $KMnO_4$-Lösung ohne Katalysator ausgeführt. Die Eiweißstoffe werden 30 Minuten mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung vor der Behandlung mit Permanganat gekocht. Etwaiger in organischen Substanzen vorhandener Phosphor wird zu Phosphorsäure oxydiert und kann im Verbrennungsrückstand nach Zerstörung des Permanganats und Mangandioxyds durch Oxalsäure, in salpetersaurer Lösung als Molybdat bestimmt werden. Bei der Verbrennung von chlorhaltigen organischen Substanzen muß Silbernitrat der Verbrennungsflüssigkeit zugefügt werden, da anderenfalls Chlor in die zur Absorption dienenden Apparate gelangt.

Um die Brauchbarkeit der Methodik der Verbrennung von organischen Substanzen durch Oxydation auf nassem Wege zu erhöhen,

---

[1]) *B. Lustig*, diese Zeitschr. 184, 964, 1927.

versuchten wir, den Stickstoff und etwaigen Halogengehalt organischer Stoffe im Verbrennungsrückstand quantitativ zu bestimmen. Wir gingen zuerst an die Untersuchung der Veränderungen, die der in organischer Substanz in verschiedener Bindung vorhandene Stickstoff (besonders in Aminoform) bei der Oxydation mit Permanganat erleidet.

Die darüber in der Literatur vorhandenen Angaben sind spärlich und in manchem einander widersprechend, so z. B. finden *Chevillot* und *Eduard*[1]), daß Permanganat in neutraler Lösung aus Ammoniak Stickstoff entwickelt. *Cloer* und *Guignet*[2]) fanden, daß Ammoniak durch Permanganat in der Kälte zu KNO_2, in der Wärme zu KNO_3 oxydiert wird. In alkalischer Lösung wird Ammoniak durch Permanganat nach *Hoogewerf* und *Van Dorp*[3]) nicht angegriffen. Nach *Tamm*[4]) wird Ammoniak durch $KMnO_4$ zu NH_4NO_2 umgewandelt.

Wir untersuchten den Verbrennungsrückstand verschiedener stickstoffhaltiger, organischer Verbindungen auf Ammoniak, Nitrit und Nitrat. Nitrit konnte bei keiner Substanz nachgewiesen werden. Bei Nitro-, Azo- und Ringstickstoffverbindungen war der Stickstoff als NO_3 im Verbrennungsrückstand enthalten. Bei Amino, Ammoniumverbindungen und Eiweißstoffen wurden im Verbrennungsrückstand sowohl NH_3 wie NO_3 gefunden. Bei Steigerung der Konzentration der verwendeten Permanganatlösung fand eine Vermehrung des NO_3 statt. Gleiche Erscheinungen wie Aminoverbindungen zeigten Ammonsulfatlösungen bei der Oxydation mit Permanganat in schwefelsaurer Lösung. Nur wenn eine verdünnte Ammonsulfatlösung mit einer sehr verdünnten Permanganatlösung gekocht wurde, konnte NO_3 nicht nachgewiesen werden.

Zur quantitativen Bestimmung verwendeten wir die Methode von *Devarda*[5]), nach welcher der nebeneinander vorhandene Nitrat- und Ammoniakstickstoff zusammen als Ammoniak bestimmt werden kann. Die Verbrennung der organischen Substanz wurde mit einer 1% schwefelsauren Permanganatlösung in Gegenwart von Platin als Katalysator ausgeführt, da bei der Verwendung einer konzentrierten Permanganatlösung im Verbrennungsrückstand große Mn_2O-Schlammmassen beim Versetzen mit Kalilauge ausfallen, was ein starkes Stoßen des Kolbens beim Kochen verursacht. Die zur Verbrennung verwendete Schwefelsäure muß auf ihren Stickstoffgehalt (NH_3) untersucht werden. Die Stickstoffbestimmung wurde auf folgende Weise ausgeführt: Im Verbrennungsrückstand wird mit Oxalsäure das vor-

---

[1]) *Gmelin Kraut* **3** (2), 347, 1908.
[2]) C. r. **47**, 710.
[3]) Ber. **10**, 1836, 1877.
[4]) Chem. News **25**, 1872.
[5]) Zeitschr f. anal. Chem. **33**, 113, 1894; *Treadwell*, Quantit. Analyse 1921, S. 385.

handene $KMnO_4$ und MnO_2 aufgelöst. Vom Kolben führt ein zweimal gebogenes, mit einem Vorstoß versehenes Glasrohr zu einem vertikalen Kühler, an dessen unterem Ende ein mit n/10 HCl gefülltes Peligot sich befand. Es wurden dann 3 g fein pulverisierter *Devarda*scher Legierung, 50 ccm 40 % KOH und 5 ccm Alkohol zugegeben, der Kolben auf 50° C erwärmt, um die Reaktion zu beschleunigen, dann eine Stunde bei abgedrehter Flamme stehengelassen. Es wurde dann die Hälfte bis ein Drittel der Kolbenflüssigkeit in den Peligot überdestilliert und der Überschuß der HCl mit n/10 NaOH und Cochenille als Indikator zurücktitriert. Die Verbrennung von Amino-, Ammoniumverbindungen und Eiweißstoffen geschah in sehr verdünnter Lösung (400 bis 500 ccm Flüssigkeit und 40 bis 120 mg Substanz), die verwendete Permanganatlösung (4 % $KMnO_4$, 3 % H_2SO_4, 10 bis 15 % Na_2SO_4) wurde sukzessive in Mengen von je 10 ccm durch den Tropftrichter zugegeben, da bei der Verbrennung mit konzentrierter Permanganatlösung Stickstoffverluste bis 8 % eintraten. Bei Eiweißstoffen wurde der Peligotinhalt der Kohlenstoffbestimmung nach der CO_2-Titration mit den Verbrennungsrückständen vereinigt, da infolge der Vorbehandlung mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischer Lösung eine wenn auch geringe Menge NH_3 in den Peligot gelangt. Der Stickstoffgehalt wurde bei allen Substanzen, mit Ausnahme des Caseins, bei dem er nach *Dumas-Pregl* bestimmt wurde, aus der Strukturformel berechnet (Tabelle I).

Die Verbrennungen ergaben, daß Nitro-, Amino- und Ringstickstoff im Verbrennungsrückstand der Kohlenstoffbestimmung durch Behandlung mit KOH und *Devarda*scher Legierung quantitativ bestimmt werden können. Dasselbe gilt für den Stickstoff der Eiweißstoffe und Alkaloide. Nicht quantitativ bestimmbar ist der Stickstoff der Azo- und Diazoverbindungen, da er nur zum geringen Teile in NO_3 umgewandelt wird. Der Rest entweicht wahrscheinlich als elementarer Stickstoff. Die Fehlergrenze der Bestimmungen betrug bei den verwendeten Substanzen 1 bis 3 %.

Wir gingen nun dazu über, den Halogengehalt organischer Substanzen quantitativ zu bestimmen. Wir untersuchten zuerst, ob bei allen halogenhaltigen Substanzen ein Zusatz von Silbernitrat zur Verbrennungsflüssigkeit notwendig ist.

Der Zusatz von Silbernitrat zur Verbrennungsflüssigkeit war bei allen chlor- oder bromhaltigen Substanzen notwendig, da widrigenfalls Chlor oder Brom in die Absorptionsapparate gelangt. Bei jodhaltigen Substanzen war der Zusatz von Silbernitrat nicht notwendig. Die Verbrennungen wurden mit einer verdünnten Permanganatlösung ausgeführt. In den Verbrennungsrückständen von chlor- oder bromhaltigen organischen Substanzen wurden die Halogene als AgCl oder

Tabelle I.

Bestimmung von Kohlenstoff und Stickstoff in organischen Substanzen auf nassem Wege.

Art und Menge der Substanz		Verbrennungszeit	Berechnete Menge CO_2 in ccm n/4	Gefundene Menge CO_2 in ccm n/4	Berechnete Menge N in ccm n/10	Gefundene Menge N in ccm n/10
m-Dinitrobenzol	0,0714	1h30'	20,35	20,72	8,81	8.58
	0,0582	1 30	16,60	16,85	7,10	7.00
	0,1165	1 30	33,24	32.96	14,22	14.05
	0,0952	1 30	27,13	26.95	11,41	11.25
Glykokoll	0,0853	2 30	18,17	18,35	11,34	11,05
	0,1525	2 30	32,58	32,25	20,28	19.95
	0,1574	2 30	33,52	33,25	20,93	20.48
	0,1143	2 30	24,35	25,32	14,86	14.40
	0,1535	2 30	32,70	32,55	19,95	19,55
p-Nitranilin	0,1134	2	39,45	39.25	16,60	16.25
	0,0859	2	29,90	29,85	12,48	12.35
	0,0577	2	20,70	19,95	8,45	8.20
	0,1202	2	40,18	39,87	17,43	17,12
p-Oxychinolin	0 1036	1 30	51,50	50,95	6,84	6.65
	0,0994	1 30	49,30	49,15	6,78	6,52
	0,0852	1 30	42,26	41,95	5,62	5.45
	0,0949	1 30	47,07	46,85	6,26	6.05
Casein	0,1696	2 30	54,30	53,95	18,15	18.05
	0,1458	2 30	46,32	46,15	15,60	15.38
	0,0853	2 30	27,30	27,25	9,13	8.85
	0,1025	2 30	32,83	32,55	10,97	10,65
Strychnin	0,0887	1	44,62	44,45	5,32	5,45
	0,0687	1	34,55	35,26	4,12	4,05
	0,1052	1	52,92	52,58	6,31	6,15
	0,0858	1	43,16	42,95	5,15	4.97
o-Amidoazotoluol	0,0784	1 30	38,80	38,55	10,35	3.55
	0,0652	1 30	32,27	31,95	8,61	3,75
	0,1325	1 30	65,58	65,18	17,49	8,25
	0,0862	1 30	42,67	42,38	11,38	3,97

AgBr gefunden, freies Chlor, Chlorat oder Bromat konnten nicht nachgewiesen werden, was mit den darüber vorhandenen spärlichen Literaturangaben übereinstimmt.

So wird z. B. Brom nach *Hempel*[1]) auch in einer schwefelsauren Permanganatlösung nicht oxydiert. Jod und Jodide werden nach *Reinige*[2]) oder *Gröger*[3]) in neutraler und alkalischer Lösung quantitativ zu Jodat oxydiert, in saurer Lösung wird Jod vom Permanganat aus Jodiden[4]) in Freiheit gesetzt.

Wir fanden im Verbrennungsrückstand der Oxydation von organischen, jodhaltigen Substanzen mit schwefelsaurer Permanganatlösung

---

[1]) Ann. d. Chem. u. Pharm. **107**, 100.

[2]) Zeitschr. f. anal. Chem. **9**, 39, 1870.

[3]) Zeitschr. f. angew. Chem. **7**, 52, 1894.

[4]) *Koninck Meinecke*, Mineralanalyse **2**, 596, 1904.

nur einen geringen Teil des Jods als freies Jod, die Hauptmenge war als Jodid in der Flüssigkeit vorhanden. Auch wenn wir den Verbrennungsrückstand mit Soda im Überschuß versetzten und eine Stunde kochten, war nur ein sehr geringer Teil des Jods in Jodat umgewandelt, die Hauptmenge war als Jodid vorhanden.

Nachdem sowohl die Form, in welcher die Halogene in den Verbrennungsrückständen vorliegen, sowie die Art und Weise, sie quantitativ im Verbrennungsrückstand zurückzuhalten, Klarheit geschaffen war, versuchten wir sie quantitativ zu bestimmen. Zuerst mußte das in der Verbrennungsflüssigkeit vorhandene Permanganat und Mangandioxyd in eine lösliche Form übergeführt werden. Von den dafür in Betracht kommenden Reagenzien wie Oxalsäure, Bisulfite und Wasserstoffsuperoxyd fiel die Verwendung von Oxalsäure und Natriumbisulfit weg, da sie eine teilweise Reduktion des $AgCl$ und $AgBr$ verursachten, besonders die Oxalsäure bei $AgBr$. Das Wasserstoffsuperoxyd verwendeten wir meist in Form von Perhydrol, da das 3 % meist chlorhaltig ist. Die Lösung wurde bis zur Zerstörung des Permanganats und eines großen Teiles des Mangandioxyds mit Wasserstoffsuperoxyd und verdünnter Salpetersäure versetzt, filtriert und mit verdünnter Salpetersäure bis zum Verschwinden der Silberreaktion im Filtrat gewaschen. Der Filterrückstand wurde in 6 % NH_3 gegeben, 15 bis 30 Minuten unter mehrmaligen Umschütteln stehengelassen, dann durch ein kleines Filter von den Filterfasern und restlichem MnO_2 abfiltriert, mit 2- bis 3 % NH_3 nachgewaschen und nach *Deniges*[1]) titriert (Tabelle II).

Die Verbrennungen ergaben, daß die gefundenen Chlor- und Bromwerte mit den berechneten übereinstimmen.

Bei der Bestimmung des Jods in organischen Substanzen wurde der Verbrennungsrückstand mit 10 % Oxalsäure bis zur Zerstörung und Lösung des $KMnO_4$ und MnO_2 behandelt, dann mit Eisenammoniumalaun im Überschuß versetzt, wodurch das gesamte als Jodid vorhandene Jod als elementares Jod ausgeschieden wurde. Die Lösung wurde dann bis zum Sieden erhitzt, das mit dem Wasserdampf weggehende Jod wurde in Kaliumjodid aufgefangen und mit n/20 $Na_2S_2O_3$ titriert (Tabelle III).

Auch hier entsprachen die erhaltenen Werte den berechneten Jodwerten.

Zusammenfassend können wir sagen, daß bei der Verbrennung von stickstoff- und halogenhaltigen organischen Substanzen auf nassem Wege der Stickstoff und die Halogene quantitativ bestimmt werden

---

[1]) C. r. 117, 1893; *Beckhurst*, Maßanalyse, S. 1006. Braunschweig, Friedr. Vieweg & Sohn, 1913.

Tabelle II.

Bestimmung von Cl oder Br neben Kohlenstoff in organischen Substanzen.

Art und Menge der Substanz		Verbrennungszeit	Berechnete Menge CO_2 in ccm n/4	Gefundene Menge CO_2 in ccm n/4	Berechnete Menge Cl oder Br in g	Berechnete Menge Cl oder Br in g
Chloranil	0,1004	2h	19,90	19,45	0,0559	0,0572
	0,1064	2	20,75	20,55	0,0593	0,0580
	0,0729	2	13,42	13,68	0,0404	0,0395
	0,0495	2	9,65	9,38	0,0277	0,0267
	0,1166	2	22,73	22,45	0,0671	0,0656
Anilin-hydro-chlor.	0,1165	2 30′	43,10	42,75	0,0319	0,0316
	0,0961	2 30	35,56	35,15	0,0263	0,0278
	0,0888	2 30	32,86	32,95	0,0243	0,0230
	0,1575	2 30	58,27	57,95	0,0433	0,0415
	0,0825	2 30	30,52	30,15	0,0226	0,0218
Thebain hydro-chlor.	0,0996	3	43,55	43,28	0,0102	0,0095
	0,1544	3	68,48	68,05	0,0158	0,0164
	0,0872	3	38,60	38,08	0,0089	0,0085
	0,1096	3	47,92	47,85	0,0112	0,0102
p-Brom-toluol	0,0802	3 30	26,26	25,82	0,0375	0,0362
	0,1106	3 30	36,02	35,95	0,0517	0,0515
	0,0682	3 30	22,30	21,95	0,0319	0,0305
Eosin	0,1127	2 30	27,85	27,58	0,0556	0,0547
	0,1025	2 30	25,30	25,15	0,0503	0,0508
	0,0979	2 30	23,29	23,05	0,0483	0,0471
	0,0917	2 30	22,74	22,25	0,0451	0,0445
	0,1258	2 30	31,19	30,92	0,0620	0,0607

Tabelle III.

Bestimmung von C und J in organischen Substanzen.

Art und Menge der Substanz		Verbrennungszeit	Berechnete Menge CO_2 in ccm n/4	Gefundene Menge CO_2 in ccm n/4	Berechnete Menge J in ccm n/20 $Na_2S_2O_3$	Berechnete Menge J in ccm n/20 $Na_2S_2O_3$
Tetra-methyl-ammonium-jodid *)	0,1219	1h30′	15,38	7,85	12,01	11,88
	0,0666	1 30	10,59	5,38	6,62	6,55
	0,1301	1 30	20,68	6,55	12,92	12,76
	0,1065	1 30	16,85	6,02	10,60	10,45
β-Jod-propion-säure	0,0998	2	11,98	11,95	10,02	10,25
	0,0642	2	7,70	7,55	6,43	6,30
	0,1597	2	19,16	18,98	16,01	15,86
	0,2506	2	30,07	30,02	25,12	25,00
	0,1808	2	21,69	21,48	18,08	17,95

*) Infolge der Flüchtigkeit der Substanz wurden nur 30 bis 60 % des C gefunden.

können. Bei chlor- und bromhaltigen Stoffen ist eine Zugabe von Silbernitrat zur Verbrennungsflüssigkeit notwendig, bei Aminosäuren und Eiweißstoffen wird die Verbrennung in verdünnter $KMnO_4$-Lösung ausgeführt. Nicht bestimmbar ist der Stickstoff der Azo- und Diazoverbindungen.

Zur Blutzuckerfrage.

II. Mitteilung:

Größe der Nichtglucosefraktion unter verschiedenen Verhältnissen.

Von

B. Sjollema.

(Aus dem Laboratorium für medizinische Veterinärchemie der Reichsuniversität, Utrecht.)

(Eingegangen am 9. April 1927.)

In dieser Zeitschrift[1]) habe ich vor kurzem eine Methode mitgeteilt, welche es ermöglicht, Disaccharide in Blutfiltraten neben Glucose zu bestimmen. Sie beruht darauf, daß Glucose im Gegensatz zu den Disacchariden (Lactose und Maltose) nicht von Kohle (*Mercks* Carbo medicinalis) gebunden wird, wenn die Lösung ein halbes Prozent Essigsäure enthält[2]). Die Disaccharide bleiben in Lösung, wenn vor dem Schütteln mit Kohle genügend Äther hinzugesetzt wird.

In derselben Mitteilung wurde darauf hingewiesen, daß der Blutzucker nicht ganz aus Glucose bzw. freier Glucose besteht, und daß nur ein kleiner Teil der Reduktion, welche von der Nichtglucose verursacht wird, auf Rechnung von bekannten Bestandteilen des Blutes (Harnsäure usw.) gestellt werden kann[3]). Die in der vorliegenden Mitteilung erwähnten Resultate wurden nach der schon beschriebenen Methode erhalten. Die Blutfiltrate stellten wir wieder nach *Folin* und *Wu* her; die Reduktion und Titration wurden nach *Hagedorn* und *Jensen* ausgeführt. Es lag auf der Hand, Filtrate zu untersuchen von Blutproben, welche Tieren und Menschen entnommen waren, bei

---

[1]) Diese Zeitschr. 182, 453, 1927.

[2]) Es gibt Kohlesorten, welche aus ½% Essigsäurelösungen Glucose festhalten. Die Lösung muß dann mehr Essigsäure (z. B. ¾%) enthalten. Auch muß dann mehr Äther verwendet werden, um Bindung von Disacchariden vorzubeugen. Ich komme darauf später zurück.

[3]) Man kann nicht ohne weiteres behaupten, daß die erste Fraktion nur aus Glucose besteht. Die zweite und dritte bestehen jedenfalls nicht aus freier Glucose.



denen der Stoffwechsel in verschiedenen Weisen anomal war, z. B. bei Diabetes und bei anderen Krankheiten, welche mit Stoffwechselstörungen anheim gehen (z. B. Acetonämie, Geburtsparese bei Kühen), nach Injektion von Insulin oder von Phlorrhizin und Fasten.

Auch mußte untersucht werden, wie es mit den neben Glucose vorkommenden Fraktionen in den Blutkörperchen und im Blutplasma steht, und welche Änderungen bei der Glykolyse auftreten.

Schließlich untersuchte ich, wie sich die *Hexosephosphatester* Kohle gegenüber verhalten. Es ist ja denkbar, daß sie einen Teil der Nichtglucosefraktion des Blutzuckers ausmachen.

Es muß hier noch eine Bemerkung über die Methode vorangehen.

Beim Blindversuch mit Wasser und gewaschenem Äther haben wir in der letzten Zeit gefunden, daß aus der Kohle oft ein wenig reduzierende Stoffe in Lösung gehen. Diese wurde in den unten mitgeteilten Analysen nicht in Abzug gebracht.

Die Zahlen für die zweite Fraktion sind daher in mehreren Fällen etwas zu hoch (vielleicht bis zu etwa 8 mg), und dieselben für die dritte also etwas zu niedrig (der Wert der ersten Fraktion bleibt unverändert). Aus diesem Grunde, und auch weil es gar nicht sicher ist, daß die zweite und die dritte Fraktion aus demselben Stoffe (bzw. verschiedenen Stoffen) bestehen, habe ich in dieser Mitteilung diese beiden Fraktionen bei der Besprechung zusammengefaßt. Eine getrennte Bestimmung hat vorläufig nur Wert für die Feststellung der Menge der Disaccharide. Übrigens ist die dritte Fraktion gewöhnlich nur klein.

Erstens wurde Blut untersucht von Kühen, die an Geburtsparese litten. Blut dieser Kühe wird unter bestimmten Verhältnissen — besonders nach der Insufflation von Luft im Euter — Milchzucker enthalten; es kommt dann auch im Harn Milchzucker vor. Für meinen Zweck war deshalb das Blut dieser Tiere ein geeignetes Material, um zu untersuchen, ob sich nach meiner Methode Milchzucker im Blute bestimmen läßt[1]).

Von den fünf nachstehenden Fällen (Tabelle I) zeigte der Harn dreimal eine Reduktion nach *Fehling*[2]). Im Falle 3 war die Reduktion nur schwach; im Falle 4 wurde im Harn etwa 0,4% Milchzucker gefunden und im Falle 5 2,7%. Aus letzterem Harn ließ sich Lactosazon darstellen (mit Hefe trat keine Gärung auf).

---

[1]) Die Blutproben wurden mit NaF konserviert (0,6 g auf 100 ccm). Glykolyse tritt dabei nicht ein.

[2]) Die Meinung, daß bei Geburtsparese der Rinder immer Hypoglykämie vorkommt und diese Anomalität eine primäre Bedeutung haben würde, wird durch diese Analysen nicht gestützt.

Tabelle I.

Blutzucker bei Geburtsparese der Kühe. Die Zahlen geben Milligramme Glucose auf 100 ccm Blut an.

Nr.	Total	Erste Fraktion	Zweite Fraktion	Dritte Fraktion *)	Zweite + dritte Fraktion
1	103,7	82,5	16,7	4,5	21,2
2	85,9	61,3	23,1	1,5	24,6
3	107,1	71,9	33,6	1,6	35,2
4	115,0	68,3	43,9	2,8	46,7
5	126,9	56,1	65,0	5,8	70,8

*) Wie schon mitgeteilt wurde, wird die dritte Fraktion oft ein wenig zu niedrig gefunden weil die Kohle an Äther und Wasser ein wenig reduzierende Stoffe abgibt.

Die Zahlen der zweiten Fraktion zeigen deutlich, daß der Milchzuckergehalt des Blutes mit dem des Harns steigt. Wenn man für normales Rinderblut eine zweite Fraktion von etwa 20 mg annimmt, so stellt sich die Menge des Milchzuckers in den drei letzten Proben auf bzw. etwa 13, 23 und 45 mg pro 100 ccm Blut.

Weil die Nichtglucosefraktion, wie später gefunden wurde, hauptsächlich in den Blutkörperchen vorkommt, ist es vorzuziehen, die Lactose im Plasma oder Serum zu bestimmen.

Zweitens wurde das Blut von Kühen untersucht, die an Acetonämie leiden. Also an einer Krankheit, bei der der Stoffwechsel sehr gestört ist. Die Tiere scheiden sehr viel Acetonkörper aus und es tritt Acidosis auf (d. h. das p_H des Blutes ist zu niedrig), sie nehmen nur wenig Futter auf.

Wie aus Tabelle II hervorgeht, kommt bei diesen Tieren Hypoglykämie vor[1]). Die *Hypoglykämie* ist beträchtlicher als man aus der Bestimmung des Totalblutzuckers ableiten würde, denn die erste Fraktion (Glucose) beträgt nur etwa die Hälfte des totalen Gehalts. Die

Tabelle II.

Blutzucker bei Acetonämie der Kühe.

Nr.	Total	Erste Fraktion	Zweite Fraktion	Dritte Fraktion	Zweite + dritte Fraktion
1	58,0	29,4	—	—	28,6
2	51,3	26,5	22,7	2,1	24,8
3	66,2	37,5	28,7	0,0	28,7
4	55,6	28,3	22,5	4,8	27,3
5	58,8	28,3	—	—	30,5
6	69,9	40,9	19,5	9,5	29,0
7	65,7	36,1	23,9	5,7	29,6
8	66,4	29,2	37,2	0,0	37,2

[1]) Die Blutproben waren immer mit NaF konserviert (0,6 g auf 100 ccm).

Acetonkörper können nicht die Ursache der hohen zweiten Fraktion sein. Eine Lösung vom Na-Salz von der β-Oxybuttersäure reduzierte die Blutlaugensalzlösung von *Hagedorn* und *Jensen* nicht. Anwesenheit von Lactose im Blute ist unwahrscheinlich. Diese Resultate zeigen, daß die Größe der zweiten Fraktion nicht mit dem Glucosegehalt abnimmt; im Gegenteil ist sie etwas höher als in normalem Rinderblut.

Drittens untersuchten wir den Einfluß der Glykolyse auf die drei Fraktionen, und zwar mit Rinderblut, weil unsere Untersuchungen über Acetonämie und Geburtsparese auch mit Rinderblut gemacht wurden. Diese Analysen konnten zu gleicher Zeit den Beweis liefern, daß Rinderblut, das mit NaF konserviert ist, nach 2 oder 3 Tagen keine Glucose usw. verloren hat. Alle Proben wurden am selben Orte bei Zimmertemperatur nach Zusatz von einigen Tropfen Toluol aufgehoben. Um Glykolyse vorzubeugen, wurden auf 100 ccm Blut 0,6 g NaF hinzugesetzt. Die Zahlen beweisen, daß selbst nach 5 und 7 Tagen in den konservierten Proben noch keine deutliche Abnahme des Blutzuckergehalts stattgefunden hatte.

Tabelle III.

Änderungen bei Glykolyse (Rinderblut).

Versuch		Total	Erste Fraktion	Zweite Fraktion	Dritte Fraktion	Zweite + dritte Fraktion
1	Sofort nach der Entnahme .	81,1	57,2	21,2	2,7	23,9
	Kons. mit NaF nach 5 Tagen	77,8	47,8	30,0	0,0	30,0
	Ohne NaF nach 5 Tagen . .	35,2	14,3	18,6	2,3	20,9
2	Sofort nach der Entnahme .	81,1	50,6	30,5	0,0	30,5
	Kons. mit NaF nach 4 Tagen	84,6	53,2	30,7	0,7	31,4
	Kons. mit NaF nach 7 Tagen	82,1	45,0	31,1	6,0	37,1
	Ohne NaF nach 4 Tagen . .	35,5	7,8	26,0	1,7	27,7
	Ohne NaF nach 7 Tagen . .	33,1	5,0	25,8	2,3	28,1

Weiter geht aus Tabelle III hervor, daß auch die Menge der beiden anderen Fraktionen sich wenig änderten.

Wo hingegen kein Konservierungsmittel verwendet wurde, nahm die Totalreduktion sehr stark ab; sie fiel auf etwa 45 bis 40% des ursprünglichen Wertes zurück. Hauptsächlich nimmt die erste Fraktion (Glucose) ab. Nach 7 Tagen waren nur noch etwa 10% der Glucose übriggeblieben. Der Wert der zweiten Fraktion sinkt nur wenig; nur etwa 12 bis 15%. Diese Fraktion ist also kaum der Glykolyse unterworfen. Da die Summe der zweiten und dritten Fraktion sich nur wenig ändert, macht sie nach Glykolyse einen viel größeren Teil der Totalreduktion aus — selbst bis etwa 85% — als ursprünglich der

Fall war. Die Zahlen lassen keine Schlußfolgerungen bezüglich der dritten Fraktion zu.

Diese Versuche über die Glykolyse des Rinderbluts machen es wahrscheinlich, daß die zweite Fraktion eine von Glucose sehr verschiedene Substanz (Gemisch) ist, und daß sie beim Stehen nicht oder nur sehr langsam durch die Wirkung von im Blute vorhandenen Agenzien in Glucose umgewandelt wird.

Daß Rinderblut keine Glykolyse zeigen würde, muß auf Grund von diesen Versuchen für unrichtig gehalten werden.

Es wurde dann der Einfluß vom Fasten und vom Phlorrhizin untersucht.

In meiner ersten Arbeit teilte ich schon die Analysen der Blutproben eines Kaninchens nach kurzem und längerem Fasten mit. Die Totalreduktion blieb dabei in beiden Fällen nahezu dieselbe (bzw. 149,8 und 150,1), die Summe der zweiten und dritten Fraktion zeigte eine deutliche Verkleinerung (sie war 38 bzw. 27,6). Es wurde mit zwei Kaninchen der Einfluß des Fastens und zu gleicher Zeit der der Injektion mit Phlorrhizin untersucht. Von beiden Kaninchen wurde vor dem Fasten und also auch vor der Injektion mit Phlorrhizin eine Blutprobe genommen.

Das eine Kaninchen (A) fastete vom Montag mittag bis Freitag mittag, also etwa 4 Tage; Donnerstag, also am dritten Tage, wurden 300 mg Phlorrhizin (suspendiert in 5 ccm Öl) subkutan injiziert; die Blutprobe wurde Freitag mittag genommen[1]).

Das zweite Kaninchen (B) fastete ebenso vom Montag mittag an, erhielt Dienstag (200 mg) und Mittwoch (300 mg) Phlorrhizin. Das Blut wurde Donnerstag morgen entnommen[2]).

	Total	Erste Fraktion	Zweite Fraktion	Dritte Fraktion	Zweite + dritte Fraktion
		Kaninchen A.			
Vor dem Fasten. .	135,9	109,3	22,7	3,9	26,6
Nach „ „ . .	119,0	87,4	28,2	3,4	31,6
		Kaninchen B.			
Vor dem Fasten. .	127,4	105,1	13,8	8,5	22,3
Nach „ „ . .	(244,2)	(210,4)	19,7	14,1	33,8

[1]) Der Harn enthielt Freitagmorgen 4% Glucose, der N-Gehalt war 0,66 %, also betrug der D-N-Quotient etwa 6. Wahrscheinlich war noch Glykogen vorhanden.

[2]) Durch ein Unglück starb das Tier, es wurde dann sofort Blut entnommen, vielleicht, nachdem es 2 oder 3 Minuten gestorben war. Weil das Tier sehr litt, wurde kurz vor der Blutentnahme Chloroform inhaliert; hierdurch können vielleicht die hohen Zahlen verursacht sein.

Ebensowenig wie nach Glykolyse haben hier die Mengen der zweiten und dritten Fraktion abgenommen; nur die erste Fraktion wird kleiner.

Eine wichtige Frage war es, wie es im Blute von Diabetikern mit den drei Fraktionen steht[1]).

Wie Tabelle IV angibt, fanden wir, daß die zweite und dritte Fraktion ungefähr denselben Wert haben, wie im Blute von normalen Personen.

Tabelle IV.

Blut von Diabetikern.

Nr.	Total	Erste Fraktion	Zweite Fraktion	Dritte Fraktion	Zweite + dritte Fraktion
1 *)	304,4	274,0	21,2	9,2	30,4
2 **)	301,0	278,2	19,7	3,1	22,8

*) Der Patient wurde täglich mit Insulin behandelt.
**) Deutliche Lipämie und Ketosis zeigten sich bei diesem Patienten.

Auch dieses Resultat macht es zweifelhaft, daß diese beiden Fraktionen mit dem Kohlehydratstoffwechsel in engem Zusammenhang stehen.

Ob die Faktoren, mit denen der Kohlehydratstoffwechsel eng verbunden ist, die Nichtglucosefraktionen beeinflussen, wurde weiter dadurch untersucht, daß wir an Kaninchen, nachdem eine Blutprobe genommen war, Insulin injizierten und nach einigen Stunden dem Tiere aufs neue Blut entnahmen. Die Tiere fasteten etwa 24 Stunden bevor sie mit Insulin behandelt wurden. Bei der Dosierung wurde damit gerechnet, daß es lieber nicht zu Konvulsionen kommen sollte.

Tabelle V zeigt, daß die Summe der zweiten und dritten Fraktion kleiner wird, wenn 3 Stunden nach der Injektion der Total-Blutzuckergehalt stark erniedrigt ist, und daß sie 7 Stunden nach dieser Behandlung wieder gestiegen ist.

Berechnet man die Prozentzahl, welche diese Summe von der Totalreduktion ausmacht, so findet man, daß diese Zahl im Mittel von den vier Proben (I, II, III, IV) vor der Behandlung 20,65, nach 3 Stunden 24,1 und nach 7 Stunden 22,05 beträgt. Die Summe der beiden Fraktionen (2 und 3) ist zwar nach 3 Stunden ein wenig erhöht, machte aber doch in diesen vier Fällen fortwährend nahezu denselben Teil der Totalreduktion aus. Dasselbe gilt nicht für die Proben IV und V, wo die Prozentzahl dieser Summe nach 3 Stunden stark gestiegen war; bei V auch noch nach 5½ Stunden.

[1]) Das Blut verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Dr. *Hymans van den Bergh*.

Tabelle V.

Der Einfluß von Insulin (Kaninchen).

Versuch		Total	Erste Fraktion	Zweite Fraktion	Dritte Fraktion	Zweite + dritte Fraktion
1	Vor der Behandlung .	126,2	103,7	4,6	17,9	22,5
	Nach 3 Stunden . .	75,0	53,8	5,7	15,5	21,2
	„ 7 „ . . .	99,5	71,7	27,8	0,0	27,8
2	Vor der Behandlung .	178,8	139,1	33,7	6,0	39,7
	Nach 3 Stunden . .	81,8	60,7	16,8	4,3	21,1
	„ 7 „ . . .	181,2	146,6	26,2	8,4	34,6
3	Vor der Behandlung .	132,9	106,6	24,1	2,2	26,3
	Nach 3 Stunden . .	78,3	55,9	10,4	4,1	14,5
	„ 7 „ . . .	164,3	131,7	27,3	5,4	32,7
4	Vor der Behandlung .	188,2	139,9	42,4	5,9	48,3
	Nach 3 Stunden . .	74,9	43,9	23,6	7,4	31,0
5*	Vor der Behandlung .	158,0	126,7	28,7	2,6	31,3
	Nach 3 Stunden . .	60,9	36,1	22,9	1,9	34,8
	„ $5^1/_2$ „ . . .	49,8	25,3	22,0	2,5	24,5
6	Vor der Behandlung .	119,8	91,7	26,3	1,8	28,1
	Nach 3 Stunden . .	78,1	59,7	16,8	1,6	18,4
	„ 7 „ . . .	159,3	124,6	32,9	1,8	34,7

*) Versuch 4 und 5 wurden mit demselben Kaninchen gemacht; die Zwischenzeit betrug acht Tage.

Beim Vergleich mit Diabetesblut, wo die Summe nur 10% oder weniger ausmacht, gibt es einen deutlichen Unterschied. Umgekehrt steigt nach Glykolyse, wie schon bemerkt wurde, die Prozentzahl sehr stark. Auch nach Fasten und Phlorrhizin scheint die Summe der zweiten und dritten Fraktion einen größeren Teil des Totalblutzuckers auszumachen. Die großen Änderungen, welche im Glucosegehalt des Blutes unter Einfluß von Insulin, Glykolyse, Fasten und Phlorrhizin auftreten, werden von den anderen Fraktionen nicht mitgemacht.

Vorläufig ist es zu sehr gewagt, aus den Daten Schlußfolgerungen in bezug auf die physiologische Bedeutung der zweiten und dritten Fraktion zu ziehen.

Mit Rücksicht auf die Bedeutung, welche die Hexosephosphorsäureester sehr wahrscheinlich bei der Dissimilation des Zuckers haben, war es von großem Interesse zu untersuchen, wie sich diese Ester Kohle gegenüber verhalten. Es wurden von den Bariumsalzen der beiden Hexosemonophosphorsäureester nach *Neuberg* und nach *Robison*[1]) und des Hexosediphosphorsäureesters[2]), je 230 mg in Natriumsalze

[1]) Ich verdanke diese Präparate der Liebenswürdigkeit des Herrn *C. Neuberg* in Berlin-Dahlem.

[2]) Die Firma Bayer und Cie. hatte die Güte, mir das Präparat zur Verfügung zu stellen, wofür ich gerne Dank sage.



umgewandelt[1]) und dann alle drei auf 1 Liter gebracht[2]). Mit diesen Lösungen wurde genau wie mit Blutfiltraten und Glucoselösungen verfahren. Es wurden also 50 ccm mit 2,5 g *Merck*scher Kohle (Carbo medicinalis) und $^1/_4$ ccm Eisessig ½ Stunde geschüttelt, die Kohle mit ½ % Eisessig gewaschen, bis im ganzen 100 ccm Flüssigkeit erhalten war; weitere 50 ccm wurden mit 2,5 g Kohle und 15 ccm gewaschenem Äther ½ Stunde geschüttelt; auch hier durch Waschen der Kohle, und zwar mit Äther, der mit Wasser gesättigt war, auf 100 ccm gebracht.

Die Flüssigkeiten wurden nach *Hagedorn* und *Jensen* in der früher mitgeteilten Weise analysiert.

Es zeigte sich dabei, daß ein Teil der Monophosphorsäureester mit Kohle und Essigsäure frei bleibt, daß sie sich aber teilweise nicht verhalten wie freie Glucose, sondern sich wie Disaccharide benehmen, denn die Ester blieben mit Kohle plus Äther völlig in Lösung. Aus der sehr verdünnten Lösung (b) blieb verhältnismäßig mehr Phosphatester frei beim Schütteln mit Kohle und Essigsäure als aus der Lösung, welche 230 mg pro Liter enthält[3]).

Es wurden folgende Resultate erhalten:

a) Konzentration: 230 mg : 1 Liter,
b) ,, 69 ,, : 1 ,,

		Erste Fraktion (Kohle-Essigsäure)	Zweite Fraktion (Kohle-Äther)	Dritte Fraktion	Total*)
Monophosphat *Robison*	a)	21,4	54,9	0	76,3
	b)	6,5	14,8	0	
Monophosphat *Neuberg*	a)	23,7	61,1	0	84,8
	b)	9,9	15,0	0	
Diphosphat	a)	25,1	28,0	0	53,1
	b)	10,1	3,7	0	

*) Diese Zahlen geben die Reduktion der nicht mit Kohle geschüttelten Lösung an.

Das molekulare Reduktionsvermögen des Monophosphats verhält sich zu dem der Glucose wie etwa 94 : 100 (*Robison* etwa 90 : 100; *Neuberg* 100 : 100); dasselbe vom Diphosphat wie etwa 60 : 100.

---

[1]) Die Bariumsalze wurden in wenig Wasser gelöst und etwas mehr als die theoretische Menge einer Natriumsulfatlösung hinzugesetzt, zentrifugiert und der Niederschlag zweimal mit Wasser, dem ein wenig einer Na_2SO_4-Lösung hinzugesetzt war, gewaschen.

[2]) Weil das Molekulargewicht dieser drei Salze bzw. 413,5 und 428 beträgt, stimmt die molare Konzentration der Lösungen, welche 230 mg pro Liter enthalten, mit der einer Lösung von 100 mg Glucose auf 1 Liter ziemlich genau überein.

[3]) Nimmt man Essigsäure von ¼ %, so bleibt mehr Monophosphatester an der Kohle gebunden; es wird mit derselben verdünnten Säure aber auch etwa ¼ Teil der Glucose festgehalten.

Es liegt also auf der Hand, weiter zu untersuchen, ob die nicht mit Kohle plus Essigsäure, wohl aber mit Kohle plus Äther in Lösung bleibende Fraktion (also die zweite Fraktion) der Blutfiltrate teilweise aus Hexosephosphorsäureester besteht.

Mit dieser Frage sind wir jetzt beschäftigt[1]).

Vom Diphosphat bleibt bedeutend mehr als von den Monophosphaten mit Kohle und Essigsäure in der Lösung.

Einmal konnte Blut von einem an Urämie leidenden Hunde untersucht werden. Das Blut enthielt 536 mg Harnstoff pro 100 ccm und 8,75 mg Aminosäuren[2]). Die drei Fraktionen betrugen 129, 57,9 bzw. 1,5 mg, der Totalblutzucker also 188,4 mg pro 100 ccm Blut. Wahrscheinlich ist die Summe der zweiten und dritten Fraktion höher, als für normales Hundeblut der Fall ist.

Schließlich wurde die Frage behandelt, ob die Nichtglucosefraktion sich hauptsächlich in den Blutkörperchen oder im Plasma befindet.

Hierzu wurde Pferdeblut (das mit NaF versetzt war) verwendet, das sich beim Stehen oder durch Zentrifugieren leicht in Plasma und Blutkörperchen trennen läßt. Die Blutkörperchen wurden nicht durch Waschen vom Plasma befreit, sie enthielten noch ziemlich viel Plasma.

Für das Plasma wurde für die drei Fraktionen gefunden: 82, 21,6, 0; total 103,6; für die Blutkörperchen: 64,9, 71, 0; total 135,9 mg pro 100 ccm[3]).

Die aus einer anderen Pferdeblutprobe zentrifugierten und einige Male mit physiologischer Salzlösung zentrifugierten Blutkörperchen enthielten als erste Fraktion 38,3, als zweite plus dritte Fraktion 49,8; total 98,1 mg.

Blutkörperchen in derselben Weise aus Kaninchenblut dargestellt, ergaben folgende Zahlen: erste Fraktion 12,8, zweite Fraktion plus dritte Fraktion 62,3; total 75,1 mg[4]).

Das Plasma desselben Blutes enthielt nur wenige Milligramme der Nichtglucosefraktion.

---

[1]) Es wurde versucht, die aus reinem Zucker dargestellte aktivierte Kohle zu benutzen, weil sie frei von Phosphorsäure ist. Sie ließ sich aber nicht verwenden; u. a., weil sie eine ziemliche große Eigenreduktion hatte.

[2]) Der Harnstoff wurde nach Behandlung mit Urease und Destillation des Ammoniaks titrimetrisch bestimmt. Die Aminosäurebestimmung wurde kolorimetrisch nach *Folin*, Journ. of biol. Chem. **51**, 377, 1922 ausgeführt.

[3]) Bei diesen Analysen wurde zur Darstellung des Filtrats für Plasma weniger, für Blutkörperchen aber mehr wolframsaures Natrium und Schwefelsäure verwendet als für Vollblut.

[4]) Die Zahlen geben nicht die absoluten Werte für die Blutkörperchen an. Es wurde eine Suspension von Blutkörperchen in NaCl-Lösung (0,95%) analysiert.

Aus diesen Analysen geht deutlich hervor, daß letztgenannte Fraktion hauptsächlich in den Blutkörperchen vorkommt. Damit steht vielleicht in Zusammenhang, daß sie von Stoffwechselstörungen — mit Ausnahme der Lactosämie — so wenig beeinflußt wird. Es ist nicht ausgeschlossen, daß sie kein Kohlehydrat ist.

Die Untersuchungen über die Blutzuckerfrage werden weiter fortgesetzt. So wird die Frage behandelt, welche Substanz die zweite Fraktion bildet. Bis jetzt konnte nur festgestellt werden, daß ihr Reduktionsvermögen durch Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure steigt.

Auch die in dieser Mitteilung erwähnten Analysen wurden von den Herren *A. Emmerie*, Assistent, und *H. Hooghoudt*, Analytiker, ausgeführt, und spreche ich an dieser Stelle meinen Dank für ihre Mitwirkung aus.

Vergleichende Blutzuckeruntersuchungen an kapillarem und venösem Blut nach Muskelbewegung.

Von

M. Dörle und **W. Liehr.**

(Aus der medizinischen Poliklinik, Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 10. April 1927.)

Frühere Versuche haben gezeigt, daß sich bei vergleichenden Untersuchungen des kapillaren und venösen Blutes an gesunden, normalen Versuchspersonen die reduzierenden Substanzen des Blutes in kapillarem und venösem Blute immer in einem bestimmten Verhältnis, das von der Nahrungsaufnahme abhängt, zueinander finden, und zwar in dem Sinne, daß die Werte beim nüchternen Menschen nahezu übereinstimmen, die Differenz zwischen kapillaren und venösen Blutzuckerwerten nahezu Null ist, und daß ferner sich nach Nahrungsaufnahme die kapillaren Blutzuckerwerte gegenüber den venösen erheblich erhöhen, und die Differenz sich zugunsten der Kapillarblutwerte ändert, also positiv wird (*Dörle* und *Frank*, 1926).

In vorliegenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob Muskelbewegung dieses Verhältnis ändert, oder ob hierdurch kapillarer und venöser Blutzuckergehalt gleichsinnig beeinflußt wird.

Über Änderungen des Blutzuckergehalts im Kapillargebiet nach Muskelbewegung liegen Untersuchungen von *Lichtwitz* 1914, *Bürger* 1916, *Brösamler* und *Sterkel* 1916, *Grote* 1918, *Cäsar* und *Schaal* 1924, *Burger* und *Martens* 1924 vor. Nach diesen Autoren setzt Muskelarbeit bei der Mehrzahl der untersuchten normalen Versuchspersonen den Blutzuckergehalt im Kapillargebiet herab. Nur in vereinzelten Fällen wird durch Arbeit der Gehalt des Blutes an reduzierender Substanz erhöht, vgl. die Untersuchungen von *Cäsar* und *Schaal* an Jugendlichen nach Wettlauf.

Unsere Versuchsanordnung war folgende: Bei gesunden, jüngeren Versuchspersonen wurde sowohl nüchtern als auch nach Nahrungsaufnahme zunächst aus der Kubitalvene und der Fingerbeere eines Armes Blut zu der Blutzuckerbestimmung entnommen. Die Bestimmung erfolgte nach *Bang*. Hierdurch wird die Gesamtheit der reduzierenden Substanzen des Blutes bestimmt. Hierauf wurden von der Versuchsperson bestimmte Bewegungen eine bestimmte Zeit aus-

geführt. Sodann wurde wieder Blut entnommen, sowohl aus Fingerbeere als aus Vene. Da, wie oben erwähnt, in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß das Verhältnis von kapillarem zu venösem Blutzuckergehalt sich im Verlauf eines Tages beträchtlich ändert, war es zunächst notwendig, festzustellen, ob dieses Verhältnis in einem kürzeren Zeitintervall, der in seiner Länge der Zeit vor und sofort nach der Muskelbewegung entsprach, konstant bleibt.

Es wurde deswegen zunächst bei zwei Versuchspersonen der Gehalt des venösen und kapillaren Blutes an Blutzucker vor und nach einer eine Viertelstunde dauernden absoluten Ruhe bestimmt.

Name	Zeit	Kapillarer Blutzucker %	Venöser Blutzucker %	Differenz %
Herr *L.*	Nachmittag	0,110	0,063	+ 0,047
	Nach Ruhe	0,108	0,070	+ 0,038
Frl. *B.*	Nachmittag	0,143	0,093	+ 0,050
	Nach Ruhe	0,142	0,095	+ 0,047

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß sich das Verhältnis von kapillarem zu venösem Blutzucker, wenn es nicht unmittelbar nach Nahrungsaufnahme bestimmt wird, im Verlauf einer Viertelstunde bei Körperruhe nicht wesentlich ändert. Zur Kontrolle wurde bei einer weiteren Versuchsperson unmittelbar nach Aufnahme stark zuckerhaltiger Nahrung (Schokolade) untersucht.

Name	Zeit	Kapillarer Blutzucker %	Venöser Blutzucker %	Differenz %
Frl. *D.*	Nachmittag	0,125	0,096	+ 0,029
	Nach 1/4 Std.	0,156	0,098	+ 0,058

Aus diesem Versuch ist zu ersehen, daß, unmittelbar nach Nahrungsaufnahme untersucht, der Blutzucker im Kapillarblut im Verlauf einer Viertelstunde beträchtlich ansteigen kann.

In der nächsten Versuchsreihe sollte festgestellt werden, wie eine kurzdauernde Muskelbewegung im Gebiet des untersuchten Stromabschnitts (Arm) den Gehalt an reduzierenden Substanzen beeinflußt. Wir ließen daher nach der ersten Blutentnahme aus Fingerbeere und Vene den zu untersuchenden Arm 2 bis 2½ Minuten strecken und beugen. Ermüdung wurde von keiner der untersuchten Personen angegeben.

Man sieht also, daß diese Bewegung, die in keinem der untersuchten Fälle zu einer Ermüdung führt, den Blutzucker im Kapillargebiet stark erhöht. Der Zuckerwert des Venenblutes wird im ersten Falle

Name	Zeit		Kapillarer Blutzucker %	Venöser Blutzucker %	Differenz %
Frl. *V.*	Nachmittag,	vorher	0,116	0,051	+ 0,065
		nachher	0,142	0,140	+ 0,002
Frl. *L.*	Nüchtern,	vorher	0,099	0,101	— 0,002
		nachher	0,206	0,103	+ 0,103
Frl. *R.*	Nachmittag,	vorher	0,155	0,121	+ 0,034
		nachher	0,206	0,118	+ 0,088

dem Zuckerwert des Kapillarblutes gleich. Der Grund hierfür liegt vielleicht in einer rascheren Durchblutung. Bei den beiden anderen Fällen ändert sich der Venenwert gegenüber dem Anfangswert nicht. Der vermehrte Zuckergehalt muß also irgendwie durch Abgabe oder Verbrauch ausgeglichen werden. Wir haben in den früheren Untersuchungen schon auf die größere Konstanz der Blutzuckerwerte des venösen Blutes hingewiesen und werden im folgenden noch darauf zurückkommen.

Bei den folgenden Versuchen wurde der Arm bis zur starken Ermüdung gestreckt und gebeugt. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie oben. Eine starke Ermüdung würde nach 5 bis 6 Minuten angegeben.

Name	Zeit		Kapillarer Blutzucker %	Venöser Blutzucker %	Differenz %
Frl. *S.*	Nüchtern,	vorher	0,103	0,101	+ 0,002
		nachher	0,080	0,100	— 0,020
Frl. *E.*	Nüchtern,	vorher	0,111	0,118	— 0,007
		nachher	0,098	0,120	— 0,022
Frl. *H.*	Nachmittag,	vorher	0,116	0,072	+ 0,044
		nachher	0,091	0,078	+ 0,013
Frl. *D.*	Nachmittag,	vorher	0,147	0,089	+ 0,058
		nachher	0,116	0,076	+ 0,040
Frl. *R.*	Nachmittag,	vorher	0,135	0,107	+ 0,025
		nachher	0,107	0,089	+ 0,018
Herr *L.*	Nachmittag,	vorher	0,119	0,098	+ 0,021
		nachher	0,092	0,102	— 0,010
Herr *L.*	Nachmittag,	vorher	0,169	0,141	+ 0,028
	6 Min.	nachher	0,061	0,101	— 0,040
	30 Min. nach Aufhören der Bewegung		0,078		

Diese Versuche zeigen, daß eine bis zur Ermüdung fortgesetzte Bewegung des zu untersuchenden Armes bei den hier untersuchten Versuchspersonen eine Abnahme des Blutzuckers in der Kapillare bringt. Diese Abnahme erfolgt ganz gleichmäßig, ob es sich um nüchterne

Versuchspersonen, oder um solche, die mehrere Stunden nach Nahrungsaufnahme untersucht wurden, handelt. Bei der Mehrzahl der hier untersuchten Fälle bleibt auch hier der Zuckerwert in der Vene annähernd konstant. Eine wenn auch geringere Abnahme als in der Kapillare findet sich nur bei Fall 4, 5 und 7. Bei Fall 7 lag starke Ermüdung vor. Durch dieses gänzlich andere Verhalten des kapillaren und venösen Blutzuckers wird die ursprünglich positive Differenz negativ.

Aus diesen Versuchen läßt sich schließen, daß bei angestrengter Bewegung der Verbrauch an reduzierender Substanz im kapillaren Stromgebiet in höherem Maße stattfindet, d. h. der Zuckerbedarf des Gewebes ein größerer ist. Gleichzeitig dürfte auch der Zustrom von Zucker in die Gewebe ein rascherer sein. Die Vene hält ihren Zuckergehalt mit größerer Konstanz fest, d. h. der Verlust wird hier wahrscheinlich durch Blutmischung rascher ausgeglichen.

In der nächsten Versuchsreihe wurde untersucht, ob der Abnahme des Blutzuckers ein Ansteigen der Blutmilchsäure entspricht; dies war nach *Lichtwitz* zu erwarten.

Als Methode der Milchsäurebestimmung wurde die Methode von *Mendel* und *Goldscheider*, 1925, gewählt, die gestattet, die Milchsäure in kleinen Blutmengen (0,5 ccm) zu bestimmen, wie sie auch bei genügend tiefem Einstich aus der Fingerbeere erhältlich sind. Auch bei diesen Versuchen wurde nach der ersten Blutentnahme aus der Kapillare und *ungestauten* Vene der zu untersuchende Arm bis zur Ermüdung gestreckt und gebeugt. Sodann wurde die zweite Blutentnahme vorgenommen. Bei sämtlichen Versuchspersonen wurde im Anschluß an eine zufällige Beobachtung der Dermographismus geprüft.

Name	Zeit		Kapillarer Blutzucker %	Venöser Blutzucker %	Differenz %	Kapillare Milchsäure mg	Venöse Milchsäure mg	Differenz mg	Dermograph
Frl. *H.*	Nüchtern,	vorher	0,123	0,120	+ 0,003	10	11	— 1	—
		nachher	0,156	0,163	— 0,007	30	22	+ 8	
H. *M.*	Nachmittag,	vorher	0,188	0,091	+ 0,097	9	9	+— 0	—
		nachher	0,240	0,160	+ 0,080	22	26	— 4	
H. *B.*	Nachmittag,	vorher	0,129	0,069	+ 0,060	8	7	+ 1	++
		nachher	0,055	0,180	— 0,125	20	28	— 8	
H. *L.*	Nachmittag,	vorher	0,208	0,089	+ 0,119	9	10	— 1	++
		nachher	0,157	0,100	+ 0,057	35	18	+ 17	
Frl. *D.*	Nachmittag,	vorher	0,162	0,098	+ 0,070	8	8	+— 0	—
		nachher	0,110	0,090	+ 0,020	42	38	+ 4	
H. *H.*	Nachmittag,	vorher	0,156	0,088	+ 0,068	12	11	+ 1	—
		nachher	0,087	0,086	+ 0,001	40	32	+ 8	

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß ein Milchsäureanstieg nicht immer zusammenfällt mit einem Blutzuckerabfall. In den Fällen 1 und 2 findet sich sowohl in der Kapillare als auch in der Vene nach der Bewegung ein ausgesprochener Blutzucker- und Milchsäureanstieg. In allen übrigen Fällen findet sich in der Vene ein Ansteigen oder Konstantbleiben der Blutzuckerwerte bei einem starken Anstieg der Milchsäure. Daraus dürfte zu schließen sein, daß die Milchsäure nur zum Teil aus den als reduzierend zu bestimmenden Substanzen des Blutes gebildet wird, zum größeren Teile aber aus Muskelglykogen und Eiweiß (*Meyerhof*, 1924, *Knoop*, 1925). Die Erhöhung der Milchsäure in der Vene entspricht den Befunden von *Mendel* und *Bauch*, wonach bei der Muskelaktion Milchsäure vermehrt gebildet und an das venöse Blut abgegeben wird, um zur Leber transportiert und zu Kohlehydraten regeneriert zu werden.

Bemerkenswert ist bei diesen Versuchen ferner, daß sich ein Ansteigen der kapillaren Blutzuckerwerte nach starker Bewegung und Ermüdung nur bei denjenigen Personen findet, die keinen Dermographismus zeigen. Beide Fälle wurden wiederholt untersucht, die Reaktion auf die Bewegung war immer dieselbe. Bei allen übrigen Personen, die mit einem Abfall der reduzierenden Substanzen auf Bewegung reagieren, besteht ausgesprochener Dermographismus. Vielleicht wäre daran zu denken, daß individuelle Verschiedenheiten vasomotorischer Reaktionen vorliegen, welche die Diffusions- und Osmosebedingungen etwas variieren. Daraus lassen sich vielleicht die verschiedenen Angaben in der Literatur über den Einfluß der Muskelbewegung auf den kapillaren Blutzucker erklären.

Für die Richtigkeit dieser Auffassung sprechen die nachfolgenden Versuche, die bei Fall 1 und 2 angestellt wurden. Der Gehalt der Kapillare an reduzierender Substanz wurde vor der Muskelbewegung, gleich nach der bis zur starken Ermüdung führenden Bewegung, 5, 10 und 15 Minuten nach Aufhören der Bewegung bestimmt. In der Tat gleicht sich die Schwankung nach 15 Minuten zum Ausgangswert wieder aus, ist auch nach ½ Stunde gleich wie nach 15 Minuten.

Name	Zeit	Vor der Bewegung %	Sofort nach d. Bewegung %	5 Min. nach Bewegung %	10 Min. nach Bewegung %	15 Min. nach Bewegung %
Frl. *H.*	Nachmittag	0,104	0,135	0,115	0,090	0,102
H. *M.*	"	0,156	0,188	0,154	0,134	0,148

Nachdem durch diese Versuche der Einfluß der Muskelbewegung eines Armes auf den kapillaren und venösen Blutzuckerspiegel nur dieses Stromgebiets untersucht worden war, gingen wir dazu über, zu

prüfen, ob durch Bewegung des ganzen Körpers der kapillare und venöse Blutzuckerspiegel eines Armes auch beeinflußt werden kann.

Wir ließen bei den nun folgenden Versuchen eine Reihe Versuchspersonen jeweils die gleiche Bewegung gleich oft wiederholen. Die Blutentnahme aus dem rechten Arme erfolgte aus Kapillare und Vene vor und sofort nach Aufhören der Bewegung. Es ist jeweils angegeben, ob die Versuchsperson durch die Bewegung ermüdet wurde oder nicht.

Name	Zeit	Kapillarer Blutzucker %	Venöser Blutzucher %	Differenz %	Ermüdung
Herr *P. P.*	Nachmittag	0,106	0,074	+ 0,032	stark
	8 Min. Laufschritt	0,148	0,131	+ 0,017	
Sämtliche Versuchspersonen laufen 20 mal 20 Treppenstufen hinauf und hinunter.					
Herr *L.*	Nüchtern, vorher	0,090	0,090	± 0	
	nachher	0,107	0,120	— 0,013	keine
Herr *M.*	Nüchtern, vorher	0,051	0,060	— 0,009	
	nachher	0,045	0,159	— 0,116	mäßig
Herr *M.*	Nüchtern, vorher	0,053	0,060	— 0,007	
	nachher	0,056	0,159	— 0,116	mäßig
Frl. *M.*	Nachmittag, vorher	0,080	0,068	+ 0,012	
	nachher	0,046	0,076	— 0,030	stark
Herr *A.*	Nüchtern, vorher	0,094	0,103	— 0,009	
	nachher	0,065	0,105	— 0,040	stark
Sämtliche Versuchspersonen stemmen ein Gewicht von 10 Pfund 20 mal.					
Frl. *V.*	Nüchtern, vorher	0,127	0,128	— 0,001	
	nachher	0,234	0,186	+ 0,048	keine
Frl. *E.*	Nüchtern, vorher	0,085	0,092	— 0,007	
	nachher	0,058	0,088	— 0,030	stark
Frl. *S.*	Nachmittag, vorher	0,177	0,145	+ 0,032	
	nachher	0,166	0,095	+ 0,072	mäßig
Frl. *M.*	Nachmittag, vorher	0,096			
	nachher	0,129			keine
15 Kniebeugen.					
Herr *M.*	Nachmittag, vorher	0,157	0,074	+ 0,043	
	nachher	0,158	0,160	— 0,002	keine

Bei diesen Versuchen ist bemerkenswert, daß die Bewegung des ganzen Körpers in allen Fällen sowohl den kapillaren als auch den venösen eines an der Bewegung wenig oder gar nicht beteiligten Stromabschnitts (Arm) beeinflußt. (In der dritten Versuchsanordnung wurde das Gewicht mit beiden Armen gestemmt.)

Überall, wo eine Ermüdung angegeben wird, finden wir einen Abfall des kapillaren Blutzuckers, ein Ansteigen da, wo keine Ermüdung vorliegt. Eine Ausnahme hiervon macht nur der erste Fall (8 Minuten

Laufschritt). Hier findet sich bei starker Ermüdung sowohl ein Ansteigen der kapillaren als auch der venösen Werte. Hier dürften auch besondere vasomotorische Einflüsse ein Rolle spielen. Dermographismus war nicht vorhanden. Der venöse Blutzuckerwert ist bei den übrigen Versuchspersonen bei starker Ermüdung gegenüber dem Ausgangswert nicht oder nur wenig geändert, stark erhöht in denjenigen Fällen, wo keine oder nur geringe Ermüdung angegeben wird.

Aus dieser letzten Versuchsreihe ist zu ersehen, daß bei Bewegung des ganzen Körpers der Blutzuckerumsatz bzw. -verbrauch auch in einzelnen Körperabschnitten erhöht ist. Im großen ganzen verlaufen die Vorgänge hier wie bei der rein örtlichen Bewegung. Auch hier findet wieder ein rascherer oder langsamerer Ausgleich bzw. Austausch von Blut- und Gewebszucker statt.

Inwieweit bei den Änderungen des Blutzuckerspiegels Verbrauch vorliegt, oder inwieweit Änderungen der Durchblutung eine Rolle spielen, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen. Dafür, daß auch Lageveränderungen, z. B. eines Armes, Schwankungen im Blutzuckerspiegel hervorrufen können, sprechen die drei folgenden Versuche.

Bei zwei normalen Versuchspersonen wurde der Blutzucker in der Kapillare bestimmt (Fingerbeere). Hierauf wurde der Arm 8 Minuten hoch gehalten, darauf 8 Minuten tief gesenkt. Sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Lageveränderung wurde der Blutzucker bestimmt.

Name	Zeit	Beginn %	Nach Hochhalten %	Nach Senken %
Frl. *D.*	Nachmittag	0,135	0,115	0,145
Dieselbe	„	0,135	0,070	0,135
Herr *L.*	„	0,084	0,055	0,082

Bei diesen Versuchen ist allerdings in Betracht zu ziehen, daß neben der Lageänderung das Hochhalten des Armes sicher mit Muskelarbeit verbunden ist, die vielleicht zum Verbrauch führen kann.

Im ganzen ist aus den vorliegenden Versuchen zu ersehen, daß die reduzierenden Substanzen im Kapillargebiet, als dem Ort der stofflichen Umsetzungen, starken Schwankungen unterworfen sein können. Das venöse Blut zeigt eine größere Konstanz. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, klinisch verwertbare Blutzuckeruntersuchungen im Kapillargebiet nur nach absoluter Muskelruhe vorzunehmen.

Zusammenfassung.

Bei Muskelbewegung in einem Stromgebiet (Arm) unterliegt der kapillare Blutzuckerspiegel dieses Stromgebiets starken Schwankungen.

Führt die Muskelbewegung nicht zur Ermüdung, dann wird er erhöht, führt sie zur Ermüdung, erniedrigt. Er kann sich aber auch nach starker Ermüdung vorübergehend erhöhen. Offenbar liegen hier individuelle Verschiedenheiten vasomotorischer Reaktionen vor.

Der venöse Blutzucker zeigt eine ausgesprochen größere Konstanz, d. h. die Schwankungen finden einen rascheren Ausgleich.

Milchsäure und Blutzuckerwerte nach Muskelbewegung lassen sich nicht in Beziehung setzen.

Bei Muskelbewegung des ganzen Körpers wird der kapillare und venöse Blutzuckerspiegel eines an der Bewegung wenig oder gar nicht beteiligten Stromgebiets (Arm) ebenfalls beeinflußt. Der kapillare Blutzuckerspiegel wird bei geringer oder gar keiner Ermüdung erhöht, bei starker Ermüdung im allgemeinen erniedrigt. Der venöse Blutzuckerspiegel erhöht sich, wenn keine Ermüdung vorliegt, vorübergehend, bei Ermüdung bleibt er konstant.

Die Verschiedenheiten weisen auf individuell und durch die verschieden intensive Muskelarbeit bedingte, schwankende Austauschvorgänge des Blutzuckers im Kapillargebiet hin. Sie bedingen leichte quantitative und zeitliche Unterschiede des Ausgleichs der kapillaren Veränderungen im venösen Blute.

Literatur.

1) *Bürger*, Kiel. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **87**, H. 4. — 2) *J. Burger* und *L. Martens*, Klin. Wochenschr. 1924, H. 41. — 3) *Brösamler* und *Sterkel*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **130**. — 4) *Cäsar* und *Schaal*, Zeitschr. f. klin. Med. **98**, 1924. — 5) *M. Dörle* und *W. Frank*, diese Zeitschr. **179**, 190, 1926. — 6) *L. R. Grote*, Zentralbl. f. inn. Med. **38**, 1918. — 7) *Fr. Knoop*, Klin. Wochenschr. 1925, H. 10. — 8) *L. Lichtwitz*, Berl. klin. Wochenschr. 1914, H. 51. — 9) *O. Meyerhof*, Klin. Wochenschr. 1924, H. 10. — 10) *Br. Mendel* und *M. Bauch*, ebendaselbst 1926, Nr. 28. — 11) *Br. Mendel* und *J. Goldscheider*, ebendaselbst 1925, H. 6. — 12) *v. Moracweski*, Berl. klin. Wochenschr. 1915, H. 40.

Kolorimetrische Methode zur Bestimmung des Sättigungsgrades des Blutes mit Sauerstoff.

Von

J. Holló und St. Weiss.

(Mitteilung aus der I. medizinischen Klinik der Königl. ung. Pázmány-Péter-Universität Budapest.)

(Eingegangen am 10. April 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Unter Sättigungsgrad des Blutes mit O_2 verstehen wir seinen Gehalt an Oxyhämoglobin, ausgedrückt in Prozenten des Gesamtblutfarbstoffgehalts (Oxyhämoglobin + reduziertes Hämoglobin). Oxyhämoglobin ist gelbrot, Hämoglobin violett; der Farbenunterschied ist bei günstig gewählten Schichtdicken so ausgesprochen, daß mit einem entsprechend gebauten Kolorimeter Änderungen im prozentischen Gehalt der beiden Komponenten mit einer Fehlerbreite von $\pm 2\%$ gut zu bestimmen sind. Kolorimeter mit hintereinander gestellten Doppelkeilen — wie solche zur Analyse von Farbstoffgemischen öfters empfohlen wurden — entsprechen nicht unserem Zwecke. Sind beide Keile aneinander befestigt und zusammen zu bewegen, so ist durch die Bewegung nur die Nuance (Qualität), nicht aber die Intensität der Durchsichtsfarbe des Doppelkeiles zu ändern, obzwar zu unserer Methode auch die Möglichkeit der selbständigen Änderung der Intensität vorteilhaft ist; außerdem wird dabei die Farbennuance des Doppelkeiles, da in diesem Falle der eine Keil mit der Basis nach unten, der andere nach oben stehen muß, im oberen Teile des Schaufensters eine andere sein als im unteren, und dieser Nachteil kann durch den schon an sich nicht sehr vorteilhaften Gebrauch von ganz kleinen Schaufenstern nur unvollkommen ausgeschaltet werden. Sind aber die Keile unabhängig voneinander zu bewegen und ist es also möglich, sie so aufzustellen, daß beide mit der Basis nach unten stehen, so sind zwar diese Fehler vermieden, doch wird dabei bei jeder Bewegung des einen Keiles immer zugleich Nuance *und* Intensität der Doppelkeildurchsicht verändert und die Bestimmung dadurch sehr erschwert.

Eines weiteren Nachteils, speziell zu unseren Zwecken, werden wir später gedenken.

Das von uns gebrauchte Kolorimeter, das nach unseren Angaben durch die *Hellige*sche Fabrik gebaut wurde, ist ein *Duboscq*sches Kolorimeter, das mit Benutzung einer älteren und ziemlich vergessenen Anregung von *Plesch* zur Durchführung von Farbennuanceuntersuchungen folgend umgeändert wurde: Auf der einen Seite des Instruments ist zwischen dem feststehenden Prisma und beweglichen Trog noch ein zweiter, selbständig auf und ab beweglicher Trog eingeschaltet, der in den unteren größeren Trog eintaucht, so daß die durchzublickende Schichtdicke der Flüssigkeit im unteren Troge durch die veränderliche Distanz der beiden Trogböden zueinander reguliert wird. Die Schichtdicke im oberen Troge ist durch die Distanz dieses Trogbodens vom Prisma gegeben; bei Bewegung nur des oberen Troges werden also die Schichtdicken der beiden Tröge immer in entgegengesetzter Richtung beeinflußt, die Summe jedoch der beiden Schichtdicken bleibt dabei unverändert; diese Summe (Farbenintensität) kann durch Einstellung des unteren Troges selbständig reguliert werden.

Sind beide Tröge mit je einer anderen farbigen Lösung gefüllt, so sind bei Bewegung des oberen Troges sämtliche durch die verschiedenen Mischverhältnisse der benutzten Farben möglichen Nuancen zu reproduzieren und also auch zu bestimmen; die Intensität der Mischfarbe wird durch Bewegungen des unteren Troges eingestellt. Diese letztere Größe muß nur soweit genau eingestellt werden, daß ihre eventuell auffällige Ungleichheit mit der Intensität der untersuchten Farbe das Auffinden der Farbenqualität nicht störe. Das Verhältnis der beiden Farbkomponenten in der untersuchten Lösung der Mischfarbe, die ihrerseits unter dem Prisma der anderen Kolorimeterseite zu liegen kommt, kann bei Farbengleichheit der beiden Gesichtsfelder an den beiden Skalen der beiden Tröge abgelesen werden. Das Kolorimeter kann natürlich auch als gewöhnliches *Duboscq*sches Kolorimeter benutzt werden[1]).

Bei Untersuchung des Blutes wird der eine Trog mit reiner Oxyhämoglobin- der andere mit reiner Hämoglobinlösung gefüllt (Verschaffung dieser Lösungen siehe später). Das zu untersuchende Blut wird anstatt in einem offenen Troge — wodurch es oxydiert würde — in einer schmalen, geschlossenen Küvette untersucht. Die Küvette hat eine Hohlzylinderform mit einem doppelten Glasboden; der eigentliche Küvettenraum wird durch den Spalt zwischen den beiden Glasplatten des Bodens gebildet und kommuniziert mit einem feinen Kanal

---

[1]) Das Instrument ist unter dem Namen „Doppel-Farbenmesser" bei der Firma F. Hellige u. Co., Freiburg i. Br., zu haben.



nach außen, der nur für eine Injektionsnadel durchgängig sein muß; er ist also mit einer Injektionsspritze leicht zu füllen und auszuspülen (was durch seinen geringen Rauminhalt sehr erleichtert wird) und ist trotzdem nach außen praktisch isoliert, da die Diffusion des Sauerstoffs, wie man sich am Farbenwechsel des Blutes in der Küvette leicht überzeugen kann, nur sehr langsam, in mehreren Stunden, vor sich geht. Der Küvettenraum hat eine Schichtdicke von 1 mm; für anämisches Blut und für stärkere Blutverdünnungen ist eine zweite Küvette mit

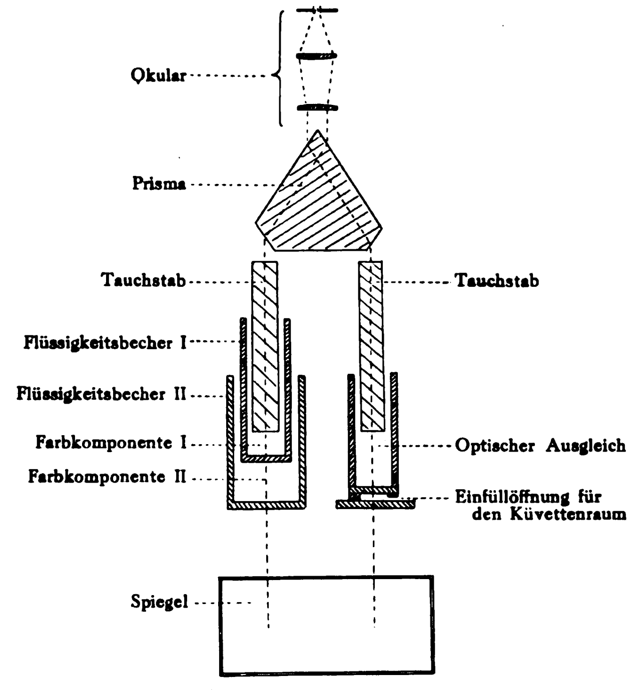


Abb. 1. Doppelfarbenmesser.

einer Schichtdicke von 3 mm sehr vorteilhaft. Der obere offene Raum wird mit Wasser gefüllt, wodurch auch die Wasserschichtdicke auf beiden Seiten des Kolorimeters gleich hoch gestellt werden kann, womit eine viel bessere Symmetrie des Apparats erreicht wird; das ist ein weiterer Vorteil gegenüber Doppelkeilkolorimetern (sowie gegenüber gewöhnlichen *Duboscq*schen Einrichtungen).

Zur Bestimmung muß das Blut hämolysiert und verdünnt werden; wir benutzen dazu eine etwa 0,1 % wässerige Lösung von Na_2CO_3 und verdünnten fünf- bis zehnfach, am besten etwa sechsfach; Genauigkeit bei der Verdünnung ist nicht notwendig. Zu einer Bestimmung

sind 4 ccm *verdünntes* Blut genügend; durch einen einfachen Kunstgriff (siehe später) ist es jedoch zu erreichen, daß schon $^3/_4$ ccm verdünntes Blut genügen können (entspricht 0,1 ccm unverdünnten Blutes), so, daß das Blut eventuell auch aus der Fingerbeere entnommen werden kann.

Durch die Verdünnung darf der Sättigungsgrad des Blutes nicht verändert werden. In *idealer* Weise könnte das nur erreicht werden, wenn die Verdünnungsflüssigkeit dieselbe O_2-Spannung hätte wie das Blut. *Praktisch* ist das aber sehr einfach: Die Affinität des Hämoglobins zu O_2 ist bei Zimmertemperatur und im alkalischen Milieu eine außerordentlich große (siehe z. B. *Barcroft*, The respiratory function of the blood), so daß man annehmen kann, daß alles in der Lösung vorhandene Oxygen gebunden wird; das Blut muß also mit O_2-freier Flüssigkeit verdünnt werden.

(Es läßt sich leicht berechnen, daß eine Abweichung von z. B. 10 mm O_2 = 50 mm Luft zwischen der Spannung der Verdünnungsflüssigkeit und der idealen O_2-Spannung nur einen Fehler von 1% verursacht; 10 mm $O_2 = \frac{3 \times 10}{760} = 0{,}04$ Vol.-% O_2; bei sechsfacher Verdünnung ist das 0,24 Vol.-%; die Sauerstoffkapazität des Blutes beträgt jedoch im Durchschnitt 20 Vol.-%. Wegen der schlechten Löslichkeit des Sauerstoffs im Wasser ist auch der O_2-Gehalt des Serums zu vernachlässigen.)

Die Na_2CO_3-Lösung wird mit der Vakuum- oder Wasserstrahlpumpe, oder am einfachsten durch Kochen während 10 Minuten in einem Kolben mit Glasperlen von O_2 befreit; vor dem Kochen muß die Lösung wegen der Eindampfung entsprechend verdünnt werden, da konzentrierte Lösungen nicht hämolysieren. Die entgaste Lösung darf nur kurze Zeit offenstehen und soll möglichst sofort — wenn auch nicht gerade kochend — in kleine Glasröhrchen von mindestens 4 ccm Rauminhalt gegossen werden, die oben mit einem kurzen Gummirohr montiert und mit einer Klemme luftdicht und ohne Luftblase geschlossen werden, wie wir das anläßlich unserer Methode zur Bestimmung der Wasserstoffzahl des Blutes beschrieben haben[1]). Wenn man keine kleineren Röhren hat, so kann man auch gewöhnliche Zentrifugierröhrchen mit einem Rauminhalt von etwa 10 ccm benutzen, denn auch so braucht man nur 1,5 ccm Blut zu einer Röhre. Die geschlossenen Röhren können mindestens 24 Stunden lang O_2-frei aufbewahrt werden. Als Kriterium der O_2-Freiheit betrachten wir es, wenn verschiedene, z. B. 6- und 18fache Verdünnungen des entnommenen Blutes noch brauchbar übereinstimmende Resultate bei der Untersuchung ergeben. (18fache Blutverdünnungen sollen mit der 3 mm-Küvette untersucht

[1]) Diese Zeitschr. 144, 87, 1924.



werden, da sonst, bei der grünlichen Farbe des Hämoglobins in dünner Schicht, die Kolorimetrie schwieriger ist.)

Wird das Blut aus einer Vene (oder Arterie) entnommen, so muß das mit einer dichten Spritze geschehen, damit keine Luft eindringt. (Die Nadel selbst kann mit Wasser gefüllt werden.) Das entnommene Blut wird dann mit der Nadel unter die Wasserschicht der soeben geöffneten Röhre gespritzt, so daß die reine Lösung überrinnt, und dann die Klemme geschlossen. Die Röhre enthält zweckmäßig eine bis zwei Glasperlen, mit denen das Blut durchgeschüttelt wird.

In 1 bis 2 Minuten ist die Hämolyse beendet, so daß die eigentliche Bestimmung gemacht werden kann. Dazu wird wieder mit einer Spritze und Nadel hämolysiertes Blut aus der Röhre entnommen und sofort die Küvette damit durchgespült und gefüllt. Dabei muß die Küvette mit dem Öffnungskanal nach oben stehen und die Nadel ganz hinunter in die Küvette reichen. Eventuell vorhandene kleine Luftblasen können durch einen kräftigeren Stoß des Spritzenstempels leicht entfernt werden. Nun wird der obere Teil der Küvette mit Wasser gefüllt, in das Kolorimeter gebracht und auf 20 mm eingestellt. Aus dem zurückgebliebenen hämolysierten Blute wird jetzt mit der (oxygenhaltigen) Na_2CO_3-Lösung eine weitere 20fache Verdünnung gemacht und beide Tröge damit gefüllt. Durch die Verdünnung mit der lufthaltigen Lösung wird das Blut ohne weiteres vollständig oxygenisiert. In dem einen Troge wird das Blut dann mit einer Spur — stecknadelkopfgroß — Natriumhydrosulfurosum ($Na_2S_2O_4$) versetzt und umgerührt; dadurch wird das Blut sofort vollständig reduziert. Die Tröge kommen jetzt auf ihre Plätze im Kolorimeter, der untere Trog wird auf 20 mm gestellt. Die Bestimmung geschieht durch Einstellen des oberen Troges auf Farbengleichheit der beiden Gesichtsfelder.

Das Kolorimeter bzw. sein Spiegel muß so stehen, daß die beiden Gesichtsfelder im leeren Instrument gleich hell erscheinen. Die 20fache Verdünnung des hämolysierten Blutes kann auf zweierlei Art geschehen; entweder ganz genau, das hat aber nur dann einen Sinn, wenn die Küvette vorher geeicht wurde und dann der untere Trog nicht genau auf 20 mm gestellt wird, sondern auf die Zahl, die dem Ergebnis dieser Eichung entspricht, oder aber die Verdünnung geschieht nur approximativ, mit Spritze und Meßzylinder, und der untere Trog wird zuerst auf 20 mm gestellt, dann aber, nach ungefährem Einstellen des oberen Troges auf Farbengleichheit, noch einmal genauer auf möglichst gleiche Farbenintensität eingestellt und erst jetzt das genaue Einstellen auf die Nuancegleichheit vorgenommen. Dieses Verfahren — das wir selbst immer benutzen — hat den Vorteil, daß bei Serienuntersuchungen der Inhalt der Tröge nicht ausgetauscht werden muß, sondern immer

nur der untere Trog neu eingestellt, was besonders dann wichtig ist, wenn man mit sehr wenig Blut — bei Benutzung der Fingerbeere — auskommen muß. Die Berechnung in Prozenten geschieht, indem wir den abgelesenen Skalengrad des oberen Troges mit jenem des unteren dividieren und mit 100 multiplizieren. Es sei der Stand des oberen Troges 5 mm, des unteren 20 mm, so ergibt die Rechnung, wenn der obere Trog das Oxyhämoglobin enthielt, 25 % Sättigung.

Bei Bestimmung aus Fingerbeerenblut wird das Blut in einem ganz kleinen Tiegel von 4 bis 5 ccm Rauminhalt gesammelt. Der Tiegel wird dazu zuerst mit etwas Paraffin gefüllt, knapp vor Anstechen des Fingers kommt etwa 3/4 ccm O_2-freie Na_2CO_3-Lösung hinein, das aus einer geschlossenen Röhre frisch entnommen wird. Der angestochene Finger wird bis zum Boden des Tiegels, also unter Wasser gesteckt und so etwa 0,1 ccm Blut entnommen. Das Blut wird durch Schwenken gemischt und hämolysiert und dann mit der Nadel und der Spritze in die Küvette gebracht.

Die Reinigung der Küvette mit einer Spritze ist außerordentlich einfach; der alleinige Zweck der Reinigung ist übrigens, das Eintrocknen von Blutresten zu verhindern, da die Küvette immer mit der zu bestimmenden Blutlösung selbst ausgespült wird.

Die Bestimmung ist außerordentlich schnell und einfach. Kontrollbestimmungen desselben Blutes — mit je vier bis fünf Ablesungen — stimmen immer innerhalb 5 % (auf Gesamtfarbstoffgehalt bezogen) überein, bei etwas Übung jedoch noch viel besser[1]). Ein Fehler kann bei der ganz durchsichtigen Theorie des Verfahrens nur durch Benutzung von nicht O_2-freier Carbonatlösung entstehen; diese Möglichkeit läßt sich jedoch — wie schon gesagt — durch Vergleich verschieden starker Verdünnungen leicht ausschließen, so daß wir die Überprüfung unserer Methode mit anderen, viel heikleren Methoden für überflüssig halten.

Über die biologische Bedeutung der Untersuchungen, speziell in verschiedenartig entnommenen Blutproben, sowie über die wichtigen biologischen Kautelen der Blutentnahme, werden wir später berichten.

---

[1]) Der Sättigungsgrad des Blutes bleibt sowohl in der Röhre wie auch in der Küvette aufbewahrt, selbst einige Stunden lang ganz konstant.

Über die Wohnröhren der Spirographis Spallanzani. (Auffindung einer mit Oxyaminosäuren gepaarten Schwefelsäure als Grundsubstanz.)

Von

Sigmund Fränkel und Curt Jellinek.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 11. April 1927.)

Die im Meeressande lebende Spezies der Würmer Spirographis Spallanzani ist dadurch besonders bemerkenswert, daß sie sich durch Absonderung eines Sekrets Wohnröhren baut. Schon *Krukenberg*[1]) hat die Substanz dieser Röhren untersucht. Er hydrolysierte sie mit Kalilauge und erhielt eine Substanz, die er Spirographidin nannte; diese gibt Eiweißreaktionen, jedoch reduziert sie auch Kupferlösung. Durch Hydrolyse mit Salzsäure konnte er Leucin isolieren. Da die Zusammensetzung der Spirographishüllen noch sehr unklar ist, gingen wir daran, die Substanz rein darzustellen.

Die ungereinigten Scheiden geben stark *Millon*sche Reaktion, α-Naphtholreaktion und beim Kochen mit alkalischer Bleilösung Schwarzfärbung. Die *Liebig*sche Schmelze mit Salpeter und Ätzkali ergab die Anwesenheit von Schwefel und Phosphor.

Die Scheiden wurden mit 2 $^0/_{00}$ Pepsin und 2 $^0/_{00}$iger Salzsäure durch 2 Wochen bei 38^0 verdaut, die Lösung abgegossen; der Rückstand wurde nach Auswaschen mit Wasser mit 0,5 $^0/_{00}$ Trypsin und 2 %iger Sodalösung wiederum 2 Wochen im Thermostaten belassen, dann die überstehende Lösung vom unverdauten Rückstand abgegossen und dieser ausgewaschen und getrocknet.

Eine sodann vorgenommene *Liebig*sche Schmelze erwies die Anwesenheit von Schwefel und die Abwesenheit von Phosphor in der unverdauten Scheidensubstanz; weiter gab sie starke *Millon*sche Reaktion, dagegen die α-Naphtholreaktion sehr schwach und gar keine Sulfhydrylreaktion.

---

[1]) Physiologische Studien, I. Reihe, 5, 27.

Die Verdauungslösungen gaben starke *Millon*sche und *α*-Naphtholreaktion.

Es war also durch die kombinierte Pepsin- und Trypsinverdauung sowohl die Kohlenhydratgruppe als auch der mit Phosphor kombinierte Komplex und die Sulfhydrylgruppe (Cystin) entfernt worden, die Verbindung enthielt aber Schwefel in einer anderen Bindung.

Jetzt lösten wir die Substanz in 2 %iger Natronlauge und fällten sie dann wieder mit verdünnter Essigsäure aus; der Niederschlag wurde abgeschleudert, die Lösung abgegossen und der Niederschlag wieder in Lauge gelöst und mit Essigsäure gefällt. Diese Operation wiederholten wir noch zweimal; das letzte Mal suspendierten wir den Niederschlag durch 3 Tage in verdünnter Salzsäure, wuschen danach aus und trockneten die Substanz. Eine Aschenbestimmung ergab noch hohen Aschengehalt: 0,3142 g Substanz : 0,0251 g Asche = 7,99 %.

Der Körper gibt stark *Millon*sche Reaktion. Alle anderen Eiweißreaktionen sowie die *α*-Naphtholreaktion fallen negativ aus.

Die Asche war auf gewöhnlichem Wege nicht zu entfernen; deshalb lösten wir den Körper in Ammoniak durch längere Digestion auf und fällten ihn wieder mit Essigsäure; dann wurde die Substanz in 5 %iger Ammoncarbonatlösung aufgelöst und von einem unfiltrierbaren Rückstand durch tagelanges Zentrifugieren befreit. Der beim Zentrifugieren als Bodensatz erhaltene anorganische Bestandteil bestand aus Kieselsäure. Die Lösung fällten wir neuerdings mit Essigsäure aus und wuschen die ausgefallene Substanz bis zum Verschwinden der Ammoniakreaktion beim Erwärmen mit Lauge. Jetzt wuschen wir mit Alkohol und Äther und trockneten im Vakuum zur Konstanz. Die Veraschung ergab: 15,605 mg Substanz : 0,312 mg Asche = 2,00 %. Die Elementaranalyse ergibt folgende Resultate:

4,860 mg	Substanz:	8,450 CO_2, 3,110 H_2O.
5,346 ,,	,,	9,345 CO_2, 3,418 H_2O.
8,954 ,,	,,	0,923 ccm N (744 mm, 18°).
5,856 ,,	,,	0,610 ,, N (744 ,, , 18°).
47,000 ,,	,,	11,510 $BaSO_4$.
65,450 ,,	,,	15,810 $BaSO_4$.

Analysen mit Asche berechnet:

C 47,42 %	H 7,16 %	N 11,84 %	S 3,36 %
C 47,67 %	H 7,15 %	N 11,96 %	S 3,32 %

Analysen durch Abzug von 2 % Asche von der Einwage auf aschefreie Substanz berechnet:

C 48,39 %	H 7,31 %	N 12,08 %	S 3,43 %
C 48,65 %	H 7,30 %	N 12,20 %	S 3,39 %

Aus den Werten dieser Analysen errechnet sich die Formel: $C_{38}H_{68}N_8SO_{17}$.

Zur Molekulargewichtsbestimmung lösten wir eine gewogene Menge Substanz in gemessener n/10 Lauge und titrierten den Überschuß mit n/10 Säure zurück.

0,1033 g Substanz verbrauchen 2,30 ccm n/10 Lauge

$$\text{Molekulargewicht} = \frac{\text{Einwage . H}}{\text{g . H}}.$$

Daraus errechnet sich ein Molekulargewicht von 449,0 für *eine* Säuregruppe bzw. von 898,0 für *zwei* freie Säuregruppen.

Für die Formel $C_{38}H_{68}N_8SO_{17}$ ergibt die Rechnung ein Molekulargewicht von 940,87.

Da die Substanz keine Sulfhydrylreaktion gibt, versuchten wir zu konstatieren, in welcher Form der Schwefel gebunden ist. Zu diesem Zwecke hydrolysierten wir etwas Substanz durch einstündiges Kochen mit konzentrierter Salzsäure. Nach dem Verdünnen des Hydrolysats mit Wasser und blank Filtrieren, fiel auf Bariumchloridzusatz Bariumsulfat aus. Daraus schließen wir, daß die Substanz eine Sulfosäure ist, so daß sich die Formel in $C_{37}H_{66}N_8O_{12}(SO_3H)(COOH)$ auflöst.

Nunmehr haben wir mit der Substanz die Bestimmung der Aminosäuren nach der Methode von *van Slyke* vorgenommen.

6 g Substanz wurden durch 24 Stunden mit 60 g 20 %iger Salzsäure am Rückflußkühler hydrolysiert; dann wurde die Lösung im Vakuum konzentriert, bis fast alle Salzsäure abdestilliert war. Der Rückstand wurde mit warmem Wasser aufgenommen und in einem 200-ccm-Meßkolben aufgefüllt. Mit dieser Lösung I wurden die folgenden Bestimmungen gemacht:

Kjeldahlstickstoffbestimmung:
10 ccm Lösung I verbrauchen 25,20 ccm n/10 Säure.

Aminogruppenbestimmung nach *van Slyke*:
5 ccm Lösung I lieferten 22,60 ccm N (748 mm, 19°).

Sodann verdünnten wir 100 ccm Lösung I entsprechend 3 g Substanz auf 200 ccm, versetzten mit 100 ccm Alkohol und 10 % Kalkmilch im Überschuß und destillierten den Ammoniakstickstoff im Vakuum am Wasserbad ab; den Ammoniak fingen wir in n/10 Säure auf, von der 11,60 ccm verbraucht wurden. Dann filtrierten wir vom Kalkniederschlag, welcher die Melanine enthält, ab und unterwarfen den Niederschlag samt Filter dem Kjeldahlverfahren. Der Melaninstickstoff in Form von Ammoniak entsprach 24,00 ccm n/10 Säure.

Das Filtrat vom Melaninniederschlag neutralisierten wir mit Salzsäure, engten im Vakuum ein und fällten mit 18 ccm konzentrierter Salzsäure und 15 g Phosphorwolframsäure. Der Niederschlag, welcher das Arginin enthalten soll, wurde abfiltriert, in Wasser suspendiert, mit Kaliumhydroxyd unter Phenolphthaleinzusatz gerade alkalisch

gemacht und auf 800 ccm verdünnt; dann wurde mit Bariumchlorid im Überschuß gefällt, vom Barium-Phosphorwolframiat abfiltriert und im Vakuum konzentriert. Diese Lösung II wurde nun in einem 50-ccm-Meßkolben aufgefüllt und zu folgender Bestimmung verwendet:

Argininbestimmung: Arginin spaltet beim Kochen mit ganz konzentriertem Alkali die Hälfte seines Stickstoffs als Ammoniak ab. 25 ccm Lösung II wurden in einem Kjeldahlkolben mit Kühler und Kugelapparat, in welchem n/10 Säure vorgelegt war, mit 12,5 g festen Ätzkali durch 6 Stunden gekocht; sodann destillierten wir den Rest des übergehenden Ammoniaks in die vorgelegte Säure, welche in die Vorlage gebracht wurde, hinein. Der Verbrauch an n/10 Säure war 9,80 ccm.

Zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs im Filtrat der mit Phosphorwolframsäure gefällten Basen setzten wir zu diesem Filtrat bis zur schwachen Trübung Ätznatron und klärten durch wenig Essigsäurezusatz; dann engten wir ein und füllten in einem 300-ccm-Meßkolben auf. Mit dieser Lösung III bestimmten wir:

Kjeldahlstickstoffbestimmung:
25 ccm Lösung III verbrauchen 11,90 ccm n/10 Säure.
Aminogruppenbestimmung nach *van Slyke*:
10 ccm Lösung III ergaben 9,55 ccm N (743 mm, 23°).

Für 3 g Substanz berechnet ergeben sich folgende Resultate (hierbei ist zu berücksichtigen, daß bei der Bestimmung des Aminostickstoffs nach *van Slyke* für jedes vorhandene Stickstoffatom zwei Stickstoffatome gefunden werden; weiter muß man bei der Argininbestimmung den gefundenen Wert mit zwei multiplizieren, da nur die Hälfte des Stickstoffs des Arginins durch Kochen mit Ätzkali abgespalten wird):

Gesamt-N	0,3530 g =	100,00%
Gesamt-van-Slyke-Amino-N	0,2600 g =	73,65%
Ammoniak-N	0,0162 g =	4,60%
Melanin-N	0,0333 g =	9,52%
Arginin-N	0,0604 g =	17,11%
Gesamt-N im Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung	0,2001 g =	56,67%
Gesamt-Amino-N im Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung	0,1612 g =	45,67%

Da die äußerst starke *Millon*sche Reaktion auf viel Tyrosin hindeutet, haben wir noch eine kolorimetrische Bestimmung des Tyrosins nach *M. Weiss*[1]) gemacht. Diese Methode beruht darauf, daß man die auf Tyrosin zu untersuchende Flüssigkeit so lange verdünnt, bis die letzte Verdünnung eine der Standardlösung, welche man sich

[1]) Diese Zeitschr. 97, 170, 1919.



50000 : 1 = Wasser : Tyrosin herstellt, gleichende *Millon*sche Reaktion gibt.

Wir hydrolysierten 0,4438 g unserer gereinigten Substanz durch dreistündiges Kochen mit 20 %iger Salzsäure und füllten in einem Meßkolben von 50 ccm auf. Davon wurden 25 ccm abpipettiert und 17fach verdünnt; da diese Lösung noch zu starke Färbung gegenüber der Standardlösung gab, wurde sie noch auf das Achtfache verdünnt; jetzt war die *Millon*sche Reaktion, die durch Zufügen von 2 ccm einer 10 % igen Quecksilberoxydsulfatlösung in 5 % iger Schwefelsäure und 3 Tropfen einer ½ % igen Natriumnitritlösung zu 3 ccm der Tyrosin enthaltenden Lösung entstand, genau so gefärbt wie die Reaktion der Standardlösung. Die Standardlösung wurde durch Auflösen von 0,0200 g Tyrosin in 1000 ccm Wasser hergestellt. Daraus berechnet sich der Tyrosingehalt in 0,2219 g Substanz:

$$X = \frac{25 \,.\, 17 \,.\, 8}{50{,}000} = 0{,}068 \text{ g Tyrosin} = 30{,}65\ \%.$$

Bei einem Molekulargewicht von 940,87 entsprechen 30,65 % einem Molekulargewicht von 288,32. Da die Tyrosylgruppe ein Molekulargewicht von 164 hat, sind zwei Tyrosylgruppen im Mol enthalten, welche zwei Stickstoffe repräsentieren; vier weitere Stickstoffe scheinen durch eine Argininгruppe zu erklären zu sein.

Die Spirographisscheiden bestehen also aus Eiweißkörpern, welche durch peptische und tryptische Verdauung entfernt werden können. Die Grundlage aber ist ein nicht verdaulicher Körper, welcher sich als Sulfosäure repräsentiert, und zwar als eine Äther-Schwefelsäure, die mit mindestens drei Aminosäuren kombiniert ist, und zwar mit zwei Tyrosylgruppen, einer Argininгruppe und einer weiteren Aminosäure.

Über Limulus polyphemus.

Von

Sigmund Fränkel und Curt Jellinek.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig-Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 11. April 1927.)

Schon seit der Entdeckung des Limulus polyphemus waren die Zoologen darüber uneinig, ob man das Tier, welches als ein Relikt aus einer früheren Erdperiode zu betrachten ist, den Crustaceen oder den Arachniden zuteilen soll. *J. Versluys* und *R. Demoll* kamen auf Grund anatomischer und morphologischer Vergleiche zu dem Schluß, daß Limulus mit den Arachniden sehr nahe verwandt ist und mit diesen in die Klasse der Arthropoden gehört. Limulus ist nach ihrer Meinung mit den Crustaceen einschließlich Trilobiten nicht näher verwandt und stammt nicht von ihnen ab.

Bisher wurden alle Schlüsse auf Grund morphologischer Vergleiche aufgebaut. Nur *D. H. Wester* versuchte auf Grund der histologischen Verschiedenheit der Chitinauskleidung des Darms der Crustaceen, des Limulus und der Arachniden die Verwandtschaft festzustellen und fand hierbei mehr Ähnlichkeit mit den Arachniden[1]). Erst *C. Alsberg* und *Hedlom*[2]) haben den Versuch gemacht, dem Problem auf chemischem Wege näherzutreten, und aus dem Panzer des Limulus ein Chitin dargestellt, dessen Analysen jedoch sehr inkonstant waren:

C 47,50%	H 6,65%	N 7,20%
C 45,10%	H 5,47%	N 6,80%
C 43,90%	H 6,82%	N 5,81%

Die Zusammensetzung des Chitins der Crustaceen ist auch noch nicht ganz feststehend. *Ledderhose* gelang es, dasselbe in Glucosamin und Essigsäure zu spalten. Chitin aus Krebsen ist also sicher eine Polyose, bestehend aus acetylierten Glucosaminresten, wie *S. Fränkel* und *A. Kelly*[3]) nachgewiesen haben. In welchem Verhältnis aber diese

---

[1]) Zoologisches Jahrbuch 1914.

[2]) Journ. of biol. Chem. **6**, 483.

[3]) Monatsh. f. Chem. **23**, 123.

beiden aneinander gebunden sind, ist noch heute umstritten. Es ist nämlich äußerst schwierig, das Chitin rein darzustellen, da es in keinem Lösungsmittel löslich ist und daher nicht durch Umlösen gereinigt werden kann; man kann es nur durch Auskochen reinigen und erhält daher die Substanz nie ganz rein, meist durch Asche verunreinigt, wahrscheinlich aber auch durch kleine Mengen organischer Verbindungen, so daß die Analysenwerte, welche in der Literatur angegeben sind, sehr schwanken.

Wir versuchten nun einen Einblick in die Zusammensetzung des Limuluspanzers zu gewinnen.

Die äußerst harten Schalen, die uns das New Yorker Aquarium zur Verfügung stellte, enthalten im Gegensatz zu den Schalen der Crustaceen gar keinen kohlensauren Kalk. Starke Natronlauge löst nach langer Digestion bei Siedehitze einen Teil der Schale unter Zurücklassung einer weißgelben, chitinähnlichen Masse.

Konzentrierte Schwefelsäure löst beim Kochen unter Dunkelfärbung vollständig auf. Die verdünnte, schwefelsaure Lösung gibt keine α-Naphtholreaktion, reduziert aber langsam alkalische Kupferlösung.

Weiter lösten wir ein Stückchen Panzer in konzentrierter Salpetersäure. Beim Eingießen dieser Lösung in Wasser schied sich nichts ab. Sodann dampften wir die verdünnte Lösung zur Befreiung von Salpetersäure zur Sirupdicke ein und rührten den Sirup mit Alkohol an. Hierbei blieb eine weiße Substanz ungelöst, welche saure Reaktion zeigte. Diese Substanz wurde nun in Wasser gelöst und mit Calciumcarbonat neutralisiert, vom überschüssigen Calciumcarbonat abfiltriert. Das Filtrat gab mit Merkuriacetat, Silbernitrat und Bleiacetat schöne, gelbe Fällungen. Wir stellten das Bleisalz dar. Dieses verfärbt sich bei 180° und zersetzt sich bei 230°.

Verdünnte Salzsäure greift den Panzer nicht an. Konzentrierte Salzsäure löst ihn bei mehrstündigem Kochen vollständig zu einer dunkel gefärbten Lösung auf. Diese Lösung wurde zur Trockene gedampft, in Wasser gelöst und reduzierte sodann kräftig alkalische Kupferlösung. Sodann entfärbten wir mit Tierkohle, engten zur Sirupdicke ein und fällten mit Alkohol; der kristallinische Niederschlag wurde abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert; er gibt mit Silbernitrat einen in verdünnter Salpetersäure unlöslichen Niederschlag von Chlorsilber, löslich in Ammoniak, reduziert sofort Kupferlösung, und seine Lösung gibt mit Phenylhydrazin ein Osazon, welches nach Umkristallisieren aus Essigsäure bei 200° schmolz.

Die Lassaignereaktion mit dem ungereinigten Panzer ergab die Anwesenheit von Stickstoff. Die Aschebestimmung mit derselben Substanz ergab: 0,2180 g Substanz : 0,0045 g Asche (2,1 %).



Sodann verdauten wir 53 g Panzer 2 Wochen mit 2‰ Pepsin und 2‰iger Salzsäure im Thermostaten bei 37° und weiter nach 2 Wochen langem Auswaschen mit 5‰ Trypsin und 0,5 %iger Sodalösung. Jetzt wurde gründlich mit Wasser gewaschen, mit Alkohol und Äther nachgewaschen und bei 80° zur Konstanz getrocknet. Die Ausbeute betrug 35 g (66 %).

Mit der gereinigten Schale machten wir eine *Liebig*sche Schmelze und fanden weder Schwefel noch Phosphor, Brom, Jod, nur die Chlorreaktion war ganz schwach positiv.

Nun wurden 10,9 g gereinigter Panzer zweimal mit 50 ccm 3 %iger Lauge je eine Stunde gekocht. Die zurückgebliebene Masse wog nach Waschen und Trocknen 3,3 g (= 30 %). Die alkalischen Lösungen wurden vereinigt mit Essigsäure gefällt, der Niederschlag abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Er wog 0,7 g (= 6 %). Die Lösung dieser Substanz gibt stark *Millon*sche Reaktion; Biuretreaktion und α-Naphtholreaktion waren negativ. Das Filtrat von der Essigsäurefällung gibt stark die *Millon*sche und die Biuretreaktion und mit Quecksilberacetat voluminöse Fällungen.

Der in Natronlauge ungelöst gebliebene Teil wurde auf einen Tag in verdünnte Salzsäure gelegt, sodann mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Diese Substanz gibt mit Jodlösung Braunfärbung, welche durch konzentrierte Schwefelsäure in Violett übergeht; auch Methylviolett färbt sie an. Die Substanz zeigt also ganz dasselbe Verhalten wie Chitin aus Krebspanzern.

Diese Substanz hydrolysierten wir mit 20 %iger Salzsäure durch mehrstündiges Erwärmen am Wasserbad, vertrieben die Salzsäure durch Abdampfen, entfärbten die dunkel gefärbte Lösung mit Tierkohle und engten zur Kristallisation ein. Die erhaltenen Kristalle wurden aus Wasser umkristallisiert, sie zeigten dieselbe Kristallform und Achsenverhältnisse wie salzsaures Glucosamin. Auch die Analyse stimmt mit der eines Hexosaminchlorhydrats überein:

4,610 mg	Substanz:	5,622 CO_2,	2,592 H_2O
3,824 „	„	4,635 CO_2,	2,187 H_2O
6,845 „	„	0,390 ccm N	(753 mm, 16°)
12,158 „	„	0,688 „ N	(753 „ , 16°)
0,2210 g	„	0,1485 AgCl	
0,2018 g	„	0,1337 AgCl	

Formel $C_6H_{14}NClO_5$:

Ber.:	C 33,40 %	H 6,54 %	N 6,50 %	Cl 16,45 %
Gef.:	C 33,26 %	H 6,29 %	N 6,67 %	Cl 16,62 %
	C 33,06 %	H 6,40 %	N 6,62 %	Cl 16,39 %

Zur Identifizierung unserer Substanz mit Glucosaminchlorhydrat haben wir die Phenyl-Senfölverbindung nach den Angaben *C. Neubergs* und *H. Wolfs*[1]) dargestellt: 4,3 g Substanz wurden in wenig Wasser gelöst, etwas Natriumbicarbonat hinzugefügt, um die entstehende Salzsäure zu neutralisieren, 2 g Phenylsenföl und so viel Aceton zugegeben, bis klare Lösung entstand. Nach 2 Tagen wurde am Wasserbad verdampft. Es hinterblieb ein schnell erstarrendes Öl. Dieses wurde mit Wasser gewaschen, aus heißem Alkohol umkristallisiert. Die erhaltene Verbindung hat denselben Schmelzpunkt von 208° wie die aus Glucosamin aus Krebsschalen erhaltene; ebenso hoch ist der Mischschmelzpunkt beider.

Weiter stellten wir das Cinchoninsalz des Oxydationsprodukts unseres Amins mit Salpetersäure nach *Neuberg*[2]) dar: 1 g der Substanz wurde mit der doppelten Menge Salpetersäure, Dichte 1,2, am Wasserbad abgedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und zur Entfernung des Chlors mit Silbernitratlösung gefällt, vom Chlorsilber abfiltriert, mit Ammoniak neutralisiert und mit Essigsäure schwach angesäuert. Die entstandene Oxalsäure wurde sodann mit Calciumacetat ausgefällt, nach Abfiltrieren mit Ammoniak neutralisiert und mit Bleizucker bei Siedehitze gefällt. Das Bleinorisosaccharat wird abfiltriert und in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Schwefelblei wird vom Schwefelwasserstoff durch Durchleiten von Luft befreit und mit Cinchonin unter Erwärmen bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Nach dem Erkalten wird der Lösung durch Ausschütteln mit Essigester der Cinchoninüberschuß entzogen und die zurückbleibende Lösung zur Kristallisation eingeengt. Dabei fällt das Cinchoninnorisosaccharat in feinen Kriställchen aus. Nach Umkristallisieren aus Wasser schmolz es konstant bei 198°. Da *Neuberg* den Schmelzpunkt des Norisosaccharats mit 207° angibt, stellten wir auf die eben beschriebene Weise das Norisosaccharat aus Glucosamin, das wir aus Krebsschalen gewannen, dar und das Cinchoninsalz desselben, dieses schmolz jedoch bei 199°; ein Mischschmelzpunkt von 198° ergab die Identität der Substanzen.

Nachdem wir so die Identität des Hexosamins aus dem Chitin des Limuluspanzers mit Glucosamin erwiesen hatten, untersuchten wir das Chitin des Limulus. Wir reinigten eine größere Menge der Schalen durch Verdauung und Abkochen mit Lauge. Sodann wurde die Substanz auf eine Woche in 5 %ige Salzsäure gelegt, ausgewaschen, wiederum mit Lauge und nachfolgend mit Salzsäure behandelt, gründlich ausgewaschen, bis das Waschwasser keine Chlorreaktion mehr gab, mit

---

[1]) Ber. 34, 3840.

[2]) Ebendaselbst 34, 3964.

Alkohol und Äther nachgewaschen und im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Produkt war vollkommen aschefrei und lieferte folgende Analysenwerte:

7,080 mg	Substanz:	12,355 CO_2,	4,980 H_2O
5,865 „	„	10,170 CO_2,	3,960 H_2O
7,210 „	„	0,340 ccm	N (745 mm, 14°)
5,408 „	„	0,256 „	N (745 „, 14°)

Analysenresultate von Chitin aus Krebsen nach:

Autor	C %	H %	N %	Relation C:N
Ledderhose (Ber. **9**, 1200)	45,69	6,42	7,00	7,61 : 1
Araki (Zeitschr. f. physiol. Chem. **20**, 498)	46,11	6,29	6,01	8,95 : 1
H. Brach u. *Fürth* (diese Zeitschr. **38**, 470)	46,40	6,44	6,82	7,94 : 1
Th. Offer (diese Zeitschr. **7**, 117)	45,53	6,92	7,22	7,36 : 1
Unsere Analysen	47,59	7,87	5,50	10,10 : 1
	47,29	7,56	5,52	9,99 : 1

Bei den meisten der bisher gemachten Chitinanalysen läßt sich aus ihnen keine ganzzahlige Relation des Kohlenstoffs zum Stickstoff errechnen. Nur *H. Brach* und *Fürth* finden C : N wie 8 : 1. Daraus ziehen sie den Schluß, daß auf ein Mol Glucosamin im Chitin eine Acetylgruppe kommt.

Aus unseren Analysen ergibt sich die Relation des Kohlenstoffs zum Stickstoff wie 10 : 1, so daß wir daraus schließen, daß im Chitin des Limulus auf einen Glucosaminrest eine Acetylgruppe und eine sauerstofffreie Gruppe mit zwei Kohlenstoffen kommen.

Das Ergebnis unserer Untersuchungen ist folgendes:

Der Limuluspanzer hat zum Unterschied vom Chitinpanzer der Crustaceen keine Einlagerung von kohlensaurem Kalk. Hingegen besteht er ebenfalls zum Unterschied von den Panzern der Crustaceen, welche wenig Eiweiß enthalten, aus sehr viel Eiweiß, und zwar 70%. Das Chitin ist nach unseren Analysen kohlenstoffreicher und stickstoffärmer, als die Analysen des Crustaceenchitins der verschiedenen Autoren es zeigen. Unsere Analysen unterscheiden sich auch von den Analysen des Limulus-Chitins von *Alsberg* und *Hedlom*, welche untereinander ganz differente Werte geben, und zwar Unterschiede beim Kohlenstoff von 43,90 bis 47,50%, und beim Stickstoff von 5,81 bis 7,20%.

Unsere Analysen stimmen auf die Relation zehn Kohlenstoffe auf einen Stickstoff. Daraus würde sich ergeben, daß außer der Acetylgruppe noch eine sauerstofffreie Gruppe im Molekül enthalten ist, welcher eine Äthylgruppe oder zwei Methylengruppen entsprechen.

Über eßbare Holothurien.

Von

Sigmund Fränkel und Curt Jellinek.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 11. April 1927.)

Bei der mongolischen Bevölkerung Asiens sind Holothurien als Nahrungsmittel sehr beliebt. Da uns der Nährwert sowie die Verdaulichkeit interessierten, ließen wir uns durch die „The Hongkong-Comissioner Section“ aus Wembley (London) 5 Tiere im Gewicht von 900 g zuschicken. Es waren Tiere der Spezies Lily Root, welche im Süßwasser leben. Über die Substanz, aus der diese Tiere bestehen, ist nichts Näheres bekannt.

Die Voruntersuchung ergab, daß sich die Tiere bis auf einen kleinen anorganischen Rest vollständig in 5 %iger Lauge beim Erwärmen lösen. Aus dieser Lösung fällt auf Zusatz von Essigsäure ein voluminöser Niederschlag. Die Substanz enthält keinen bleischwärzenden Schwefel, gibt keine Orcinreaktion, hingegen stark die α-Naphtholreaktion. Eine vorgenommene *Liebig*sche Schmelze ergab das Vorhandensein von Schwefel und Phosphor in Spuren.

Wir verdauten zwei Tiere durch 3 Wochen mit 2 ‰ Pepsin und 2 ‰iger Salzsäure bei 37° im Thermostaten. Der unverdaute Rückstand wurde mit 5 ‰ Trypsin und 0,5 %iger Sodalösung versetzt und im Thermostaten eine weitere Woche verdaut, wobei sich alles bis auf anorganische Reste löste.

Die Verdauungslösungen behandelten wir weiter wie folgt: Die peptische Lösung wurde mit Ammoniak neutralisiert, im Vakuum eingeengt und blank filtriert. Sodann wurden Aussalzversuche gemacht, aber weder Kochsalz, Glaubersalz noch Bittersalz gaben Fällungen, nur Ammonsulfat erzeugte einen voluminösen Niederschlag. Die gesamte Lösung wurde mit Ammonsulfat ausgesalzen und die ausgefallenen Albumosen abfiltriert, mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und in Wasser gelöst. Diese Lösung gibt die Biuret- und die *Millon*sche Reaktion sowie die α-Naphtholreaktion sehr stark. Die

Tryptophanreaktion (Glyoxylsäure + konzentrierte Schwefelsäure) und die Sulfhydrylreaktion sind negativ.

Das Filtrat der ausgesalzenen Albumosen versetzten wir mit dem doppelten Volumen Alkohol und filtrierten das ausgefallene Ammonsulfat ab. Sodann wurde wieder eingeengt und neuerdings mit Alkohol gefällt. Jetzt enthielt die vom Ammonsulfat abfiltrierte Lösung nur mehr Spuren von Ammonsalz; sie gab nur starke α-Naphtholreaktion; alle anderen, wie Biuret-, *Millon*sche, Tryptophanreaktionen waren negativ. Diese Fraktion enthält also das Kohlehydrat der Tiere.

Die tryptische Verdauungslösung fällten wir mit Essigsäure und filtrierten vom Niederschlag ab. Der Niederschlag wurde nun in Ammoniak gelöst, blank filtriert, wieder mit Essigsäure gefällt und die Fällung in Wasser aufgelöst. Diese Lösung gab die *Millon*sche Reaktion und die Xanthoproteinreaktion sehr stark, die α-Naphtholreaktion und Biuretreaktion waren schwach.

Das Filtrat der Fällung mit Essigsäure engten wir im Vakuum ein und fällten es mit Alkohol; die in Wasser wieder gelöste Fällung gibt nur die *Millon*sche Reaktion. Alle anderen Reaktionen fielen negativ aus.

Zur Bestimmung der Substanzmenge, die mit Pepsin verdaulich ist, wurden 28,8 g bei 100° getrockneter Substanz durch 3 Wochen mit 2‰ Pepsin in 2‰iger Salzsäurelösung verdaut. Der Rückstand wurde dann abfiltriert und getrocknet; er wog 1,94 g = 6,73%. Es wird also schon im Magen der größte Teil der Substanz verdaut.

Weiter nahmen wir noch die Bestimmung der Aminosäuren nach der Methode von *van Slyke* vor. Es wurden 6 g der bei 100° getrockneten Substanz hydrolysiert und, wie bei Spirographis spallanzani[1]) beschrieben, behandelt; das Resultat war:

Einwage: 6 g Substanz hydrolysiert und in 200-ccm-Meßkolben aufgefüllt: Lösung I.

Kjeldahlstickstoffbestimmung:

5 ccm Lösung I verbrauchen 15,30 ccm n/10 Säure.

Aminogruppenbestimmung nach *van Slyke*:

5 ccm Lösung I liefern 29,15 ccm N (740 mm, 18°).

100 ccm Lösung I mit Kalkmilch destilliert, verbrauchen 12,70 ccm n/10 Säure, welche vom Ammoniakstickstoff herrühren, und 5,20 ccm n/10 Säure bei der Kjeldahlbestimmung des Melaninstickstoffs.

Sodann wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt und die erhaltene Basenlösung in einem 50-ccm-Meßkolben aufgefüllt (Lösung II).

Aminogruppenbestimmung nach *van Slyke*:

5 ccm Lösung II ergaben 11,2 ccm N (743 mm, 21°).

---

[1]) Siehe vorhergehende Abhandlung in dieser Zeitschrift.



Beim Erhitzen von 25 ccm Lösung II mit Ätzkali wurde von der zur Absorption des Argininstickstoffs vorgelegten n/10 Säure 13,20 ccm verbraucht.

Im Filtrat der Fällung mit Phosphor-Wolframsäure wurden nach Einengen und Auffüllen in einem 300-ccm-Meßkolben folgende Bestimmungen ausgeführt:

Kjeldahlbestimmung des Stickstoffs:
30 ccm Lösung verbrauchen 19,40 ccm n/10 Säure.
Aminogruppenbestimmung nach *van Slyke*:
10 ccm Lösung ergaben 13,05 ccm N (743 mm, 21°).

Für 3 g Substanz berechnet, ergeben sich folgende Resultate (hierbei ist zu berücksichtigen, daß bei der Bestimmung der Aminogruppenbestimmung nach *van Slyke* für jedes vorhandene Stickstoffatom zwei Stickstoffatome gefunden werden; weiter muß bei der Argininbestimmung der gefundene Wert mit 2 multipliziert werden, da nur die Hälfte des Stickstoffs durch Kochen mit Ätzkali abgespalten wird):

Gesamt-N	0,4287 g =	100,00 %
Gesamt-Amino-N	0,3330 g =	77,66 %
Ammoniak-N	0,0178 g =	4,15 %
Melanin-N	0,0073 g =	1,70 %
Amino-N der Phosphor-Wolframsäurefällung	0,0636 g =	14,83 %
Arginin-N	0,0740 g =	17,26 %
Gesamt-N im Filtrat der Phosphor-Wolframsäurefällung	0,2718 g =	63,40 %
Amino-N im Filtrat der Phosphor-Wolframsäurefällung	0,2222 g =	51,82 %

Die Aschebestimmung in der zur Analyse verwendeten Substanz ergibt: 0,7445 g Substanz : 0,0830 g Asche = 11,15 %.

Wir sehen, daß die als Nahrungsmittel verwendeten Holothurien der Hauptsache nach durch die Pepsinverdauung aufgelöst werden. Der Stickstoff dieser Eiweißkörper ist bis auf einen geringen Anteil in Form von Aminostickstoff in den Aminosäuren enthalten.

Über die sogenannte Kohlehydratgruppe im Eiweiß. (Darstellung der Glucosamino-Mannose).

Von

Sigmund Fränkel und Curt Jellinek.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig-Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 11. April 1927.)

Bekanntlich geben die meisten Eiweißkörper die Molischreaktion mit α-Naphthol und Schwefelsäure, welche Kohlehydrate anzeigt. Die Reaktion beruht wahrscheinlich auf der Bildung von Methylfurfurol, welches sich mit dem α-Naphthol kondensiert. Die Kohlehydratgruppe in den Eiweißkörpern wurde vielfach studiert.

Zuerst hat *K. A. H. Mörner*[1]) aus Globulin mit verdünnter Salzsäure eine reduzierende Substanz erhalten, die mit Phenylhydrazin Kristalle vom Schmelzpunkt 170 bis 172° lieferte. Auch *F. W. Pavy*[2]) konnte aus Eiweiß Osazone erhalten. *N. Krawkoff*[3]) erhielt auch aus Blutalbumin ein Osazon vom Schmelzpunkt 183 bis 185°. *M. Jacewicsch* konnte[4]) aus Schleim ein rechtsdrehendes reduzierendes Kohlehydrat, das eine Hexose war und ein Osazon vom Schmelzpunkt 185° gab, darstellen. Der Benzoylester dieses Kohlehydrats enthielt Stickstoff. *F. Müller*[5]) hat dann bei der Spaltung von Mucin Pentabenzoylglucosamin erhalten und aus diesem reines Glucosamin dargestellt. *S. Fränkel*[6]) hat ein Kohlehydrat aus Eiweiß dargestellt, welches ein bei 204° schmelzendes Osazon gab und ein Tetrabenzoylglucosamin vom Schmelzpunkt 194°. Ebenso hat *L. Langstein*[7]) aus kristallisiertem Serumalbumin Benzoylglucosamin gewonnen. *C. Neuberg*[8]) fand durch Hydrolyse mittels Bromwasserstoffsäure im Eigelbalbumin nach der Oxydation Norisozuckersäure, welche auf Glucosamin hinweist, sowie eine zweite Säure, die er für Zuckersäure ansieht.

---

[1]) Zentralbl. f. Physiol. **7**, 581.
[2]) Physiologie der Kohlehydrate. Wien 1895.
[3]) Pflügers Arch. **65**, 281.
[4]) Dissertation Petersburg 1897.
[5]) Sitzungsberichte der Gesellschaft für Beförderung der Naturwissenschaften in Marburg **6**, 117, 1898.
[6]) Monatsh. f. Chem. **19**, 819, 1898.
[7]) Hofmeisters Beitr. **1**, 259.
[8]) Ber. **34**, 3963.

Bei vielfachen Versuchen konnte man feststellen, daß die Menge von Kohlehydrat in den verschiedenen Eiweißkörpern verschieden groß ist. Manche, wie die Mucine, Glykoproteide und das Serumglobulin, enthalten sogar relativ große Mengen der Kohlehydratgruppe.

Wie bekannt, gibt Chitin und seine Derivate, z. B. Glucosamin, die Reaktion von *Molisch* mit α-Naphthol und Schwefelsäure direkt nicht. Ebenso gibt, wie wir festgestellt haben, reines Chondrosaminchlorhydrat (aus Nasenscheidewandknorpel von Schweinen dargestellt) die Reaktion nicht. Das Glucosamin zeigt diese Reaktion erst nach Einwirkung von salpetriger Säure enthaltender Schwefelsäure. Daher erscheint es sehr auffällig, daß die Eiweißkörper ohne weiteres und sehr stark die Molischreaktion geben, während die darin supponierte Kohlehydratgruppe (das Glucosamin) die Reaktion nicht zeigt. Um diesen Umstand aufzuklären, haben wir es unternommen, nach zwei verschiedenen Verfahren, bei welchen die saure Hydrolyse ausgeschlossen war, die Verbindung, welche die Molischreaktion zeigt, darzustellen.

In einem Vorversuche wurden 250 g Eialbumin (Trockengewicht) in Wasser gelöst, mit etwas Essigsäure und Salz in der Siedehitze koaguliert und mit heißem Wasser möglichst gut ausgewaschen; dann wurde das koagulierte Albumin in 2,5 Liter Wasser mit 250 g Bariumhydroxyd 3 Stunden lang gekocht. Man filtriert von dem Niederschlag ab und überzeugt sich, daß der Niederschlag nur ganz schwach die Reaktion gibt, die Lösung aber sehr stark. In die Lösung leitet man bei 60° Kohlensäure ein und filtriert vom ausgeschiedenen Bariumcarbonat ab. Aus der Lösung wird der letzte Rest Barium mit verdünnter Schwefelsäure ausgefällt und der kleine Überschuß von Schwefelsäure mit aufgeschlämmtem Bariumcarbonat bis zum Verschwinden der Kongoreaktion neutralisiert. Das Einengen dieser Lösung im Vakuum war äußerst schwierig, da sie furchtbar schäumte. Man konnte das Einengen mit folgendem Kunstgriff durchführen: Es wurde das gleiche Volumen Alkohol zugesetzt und bis zum Beginn des Schäumens destilliert, dann wieder Alkohol zugesetzt, bis es gelungen war, die Flüssigkeit auf einen Liter einzuengen. Diese Flüssigkeit wurde mit 2 Liter Aceton gefällt. Das ausgefällte Öl gab die Biuretreaktion sehr stark, ebenso die Molischreaktion. Die acetonige Lösung zeigte die Molischreaktion nicht. Wir versuchten nun mit Phosphor-Wolframsäure das gefällte Öl zu reinigen. Phosphor-Wolframsäure fällte die Kohlehydratsubstanz nicht; sie war also im Filtrat vorhanden. Dieses wurde von Phosphor-Wolframsäure mit Baryt befreit, das überschüssige Barium mit Kohlensäure entfernt und die eingeengte Lösung mit Sublimat gefällt. Sublimat fällt die gesuchte Substanz nicht. Ebenso fällt Bleizucker die Substanz nicht. Mit Bleizucker und Ammoniak aber kann man die Substanz vollständig aus der Lösung ausfällen, so daß die Lösung

nur noch spurenweise die α-Naphtholreaktion gibt, die Fällung aber in ungemein starkem Maße. Wir haben dann weiter beobachtet, daß diese Kohlehydrat-Bleifällung in verdünnter Essigsäure zum großen Teil löslich ist und daß der in Essigsäure unlösliche Anteil die Kohlehydratreaktion nicht gibt. Es konnte daher ein Reinigungs- und Darstellungsverfahren auf diesen Beobachtungen aufgebaut werden, welches darauf beruhte, daß man die Substanz nach alkalischer Hydrolyse des Eiweißes aus ihrer Lösung mit Bleizucker und Ammoniak ausfällte und nach gründlichem Waschen mit ammoniakalischem Wasser den kohlehydrathaltigen Bleiniederschlag mit verdünnter Essigsäure in Lösung bringt und von dem Ungelösten abfiltriert, dann wieder mit Ammoniak fällt und den Niederschlag gründlich mit Wasser auf der Zentrifuge auswäscht. Wir konnten dann sehen, daß die einfachste Art der Zerlegung des Bleiniederschlags die Behandlung dieses Niederschlags in wässeriger Suspension mit Kohlensäure ist. Man kann auf diese Weise die Bleiverbindung quantitativ zerlegen und hat dann das gesamte Kohlehydrat in wässeriger Lösung, die sich ganz gut einengen läßt. Zur Ausfällung dieser Lösung eignet sich von allen Lösungsmitteln am besten *Methylalkohol*. Die methylalkoholische Fällung löst man wieder in Wasser und fällt sie, wenn notwendig, zur Reinigung mit wässeriger Sublimatlösung aus.

Nach diesen Vorversuchen haben wir dann frisches Hühnereiweiß mit 1 kg Trockensubstanz mit Essigsäure und Kochsalz durch Kochen koaguliert. Das Koagulum wird mit 1 kg Ätzbaryt und 10 Liter Wasser durch 3 Stunden unter Ersatz des verdampfenden Wassers gekocht, vom Ungelösten abfiltriert und das Bariumhydroxyd bei 60^0 mit Kohlensäure aus dem Filtrat ausgefällt. Nach Abfiltrieren vom Bariumcarbonat wurde die Lösung mit einer gesättigten wässerigen Lösung von 500 g Bleiacetat versetzt. Unter starkem Rühren wird mit Ammoniak gefällt, bis nichts mehr ausfällt. Der das Kohlehydrat enthaltende Bleiniederschlag wird auf der Zentrifuge abgeschleudert und auf dieser weiterhin mit destilliertem, ammoniakhaltigem Wasser gewaschen. Hierauf wird der Niederschlag in verdünnter Essigsäure aufgelöst, filtriert und wieder mit Ammoniak gefällt und nun gründlich mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Der ausgewaschene Niederschlag wird in destilliertem Wasser suspendiert und mit Kohlensäure zerlegt, bis das absitzende Bleicarbonat keine Kohlehydratreaktion mehr gibt. Die filtrierte Flüssigkeit wurde nun auf 500 ccm im Vakuum eingeengt, von etwa sich abscheidenden Bleisalzen immer wieder abfiltriert und das Filtrat mit einem Überschuß von wässeriger Sublimatlösung gefällt. Man läßt mehrere Tage stehen, bis der Quecksilberniederschlag sich nicht mehr vermehrt. Nun filtrierten wir und engten das Filtrat im Vakuum auf 300 ccm ein. Auf Zusatz von 500 ccm Alkohol fiel ein

voluminöser Niederschlag aus, der nach dem Abfiltrieren an der Luft schnell zu einem Sirup zerfloß. Das Filtrat wurde weiter eingeengt und mit Methylalkohol gefällt und eine weitere Menge des an der Luft schnell zerfließenden Körpers gewonnen. Die wässerige Lösung dieses Körpers gab mit Pikrinsäure keine Fällung, ebensowenig mit Jodquecksilberkalium und mit Jod-Jodkalium. Hingegen erzeugte Pikrolonsäure und Phosphor-Wolframsäure eine Trübung. Die Lösung reagierte gegen Kongo nicht, gegen Lackmus sauer. Um diese Lösung weiter zu reinigen, wurde sie mit Kupferchlorid versetzt und mit reinster konzentrierter Lauge gefällt. Der Kupferniederschlag enthielt nun das Kohlehydrat. Er wurde abzentrifugiert und auf der Zentrifuge mit destilliertem Wasser so lange ausgewaschen, bis die Chlorreaktion und die Phenolphthaleinreaktion verschwunden waren. Der so gründlich ausgewaschene Niederschlag wurde nun in 100 ccm Methylalkohol suspendiert und so lange tropfenweise konzentrierte Salzsäure zugesetzt, bis alles gelöst war und eine schwach saure Kongoreaktion auftrat. Ein weiterer Zusatz von Methylalkohol erzeugte keine Fällung, daher wurde die methylalkoholische Lösung mit 500 ccm Äther ausgefällt. Die Fällung wurde abzentrifugiert und wieder in sehr wenig Wasser gelöst, mit Methylalkohol versetzt und mit Äther ausgefällt. Die Fällung wurde mit Äther zweimal auf der Zentrifuge gewaschen, und, um das Zerfließen zu vermeiden, noch ätherfeucht ins Vakuum über Paraffin, Kalk und Schwefelsäure gebracht und getrocknet. Die so erhaltene Substanz war nur noch schwach gelb gefärbt. Ihre wässerige Lösung war gelb gefärbt und reagierte gegen Lackmus neutral. In Äther und Alkohol ist die Substanz nicht löslich, aber leicht löslich in Wasser. Die Analyse der vakuumtrocknen Substanz gab folgende Werte:

4,980 mg	Substanz:	7,088 CO_2,	2,788 H_2O,	Asche 0,390 (7,83 %).
6,303 „	„	8,888 CO_2,	3,414 H_2O,	Asche 0,503 (7,98 %).
6,226 „	„	0,207 ccm N (743 mm, 17°).		
5,845 „	„	0,192 „ N (743 „ , 17°).		

Zur Berechnung der Analysen auf aschefreie Substanz wurde sofort von der Einwage die gefundene Asche subtrahiert und der Gehalt an Kohlenstoff und Wasserstoff auf die restliche Substanz berechnet. Bei der Stickstoffbestimmung wurden ebenfalls von der Einwage 8 % Asche abgezogen.

Für Formel $C_{12}H_{23}NO_{10}$:

Ber.:	C 42,21 %	H 6,79 %	N 4,10 %
Gef.:	C 42,11 %	H 6,80 %	N 4,16 %
	C 41,79 %	H 6,59 %	N 4,11 %

Die Ebene des polarisierten Lichtes wird von dieser Substanz nicht gedreht. Es liegt hier die Möglichkeit vor, daß die Substanz durch die Einwirkung des Ätzbaryts racemisiert wurde.

Wir versuchten nun, diese Substanz durch tryptische Verdauung zu gewinnen. Zu diesem Zwecke wurde Hühnereiweiß mit 1 kg Trockensubstanz in der oben beschriebenen Weise koaguliert und gewaschen, sodann in 15 Liter Wasser suspendiert, 200 g calcinierte Soda zugesetzt und 10 g Trypsin sowie reichliche Mengen von Chloroform und Toluol eingerührt. Die ganze Mischung wurde 4 Wochen im Thermostaten verdaut. Die Lösung wurde vom Ausgeschiedenen abfiltriert und mit Essigsäure angesäuert. Die entstehende Fällung gibt keine Kohlehydratreaktion. Das klare Filtrat wurde mit 500 g Bleizucker in wässeriger Lösung versetzt und mit Ammoniak gefällt. Der Bleiniederschlag wurde abgeschleudert, auf der Zentrifuge gewaschen, in Wasser suspendiert und mit Kohlensäure zerlegt. Das Filtrat von den Bleisalzen wurde eingeengt, da es sauer reagierte, mit wenig Soda neutralisiert und das noch in Lösung befindliche Blei mit Schwefelwasserstoff ausgefällt. Man filtriert vom Bleisulfid ab, verjagt den Schwefelwasserstoff, und nun zeigt es sich, daß Sublimat selbst nach einigen Tagen keine Fällung gibt, daher wird sofort mit Kupferchlorid versetzt und mit reinster Kalilauge die Kupferverbindung ausgefällt. Die Kupferfällung wurde auf der Zentrifuge chlor- und alkalifrei gewaschen, in Methylalkohol suspendiert und mit Salzsäure zerlegt. Die klare grüne Lösung wurde mit Äther ausgefällt, mit Äther gewaschen und nochmals mit Methylalkohol und Äther umgefällt. Sie zeigte die gleichen Eigenschaften wie die durch die Barytspaltung gewonnene Verbindung und erwies sich ebenfalls als optisch inaktiv.

Die Analyse der vakuumtrockenen Substanz ergab:

4,102 mg Substanz: 6,175 CO_2, 2,333 H_2O, Asche 0,082 (2,00 %).
5,810 „ „ 8,712 CO_2, 3,378 H_2O, Asche 0,110 (1.89 %).
4,198 „ „ N 0,140 ccm (748 mm, 15°).
4,530 „ „ N 0,153 „ (748 „ , 15°).

Zur Berechnung der Analysen auf aschefreie Substanz wurde wie bei den früheren Analysen die Asche sofort von der Einwage subtrahiert, ebenso bei den Stickstoffbestimmungen 2 % Asche abgezogen.

Für Formel $C_{12}H_{23}NO_{10}$:

Ber.:	C 42,21 %	H 6,79 %	N 4,10 %
Gef.:	C 41,89 %	H 6,49 %	N 3,97 %
	C 41,68 %	H 6,63 %	N 4,02 %

Das durch Verdauung erhaltene Präparat war weitaus aschеärmer als das durch Barytspaltung erhaltene.

Spaltung der Substanz.

Die erhaltene Verbindung reduziert Kupferlösung nicht. Wir haben nun versucht, sie durch Salzsäure zu spalten. 1 g der Verbindung wurde mit 20 ccm 20 % Salzsäure eingeschlossen und in einem zu-

geschmolzenen Glasrohr 6 Stunden lang in der Wasserbadkanone erhitzt. Nach dem Öffnen des Rohres wurde die Salzsäure im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen. Diese wässerige Lösung gab nun mit Alkohol eine weiße kristallinische Fällung; diese wurde aus wenig salzsäurehaltigem Wasser umkristallisiert, sie zeigte keinen Schmelzpunkt, bräunt sich bei 230° und verkohlt bei 280°. Die Substanz ist ein Chlorhydrat, da sie in verdünnter, salpetersaurer Lösung mit Silbernitrat einen Chlorsilberniederschlag gibt. Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

6,318 mg Substanz: 7,810 CO_2, 3,780 H_2O.
5,636 „ „ 0,308 ccm N (746 mm, 14°).

Glucosaminchlorhydrat, Formel $C_6H_{14}NClO_5$:

Ber.:	C 33,40%	H 6,54%	N 6,50%
Gef.:	C 33,71%	H 6,69%	N 6,38%

Aus dem alkoholischen Filtrat wurde der Alkohol abdestilliert. Es hinterblieb ein Sirup, welcher in Wasser gelöst wurde. Diese Lösung versetzten wir mit einer Lösung von Phenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat; nach zweitägigem Stehen schied sich ein feinkristallinisches Hydrazon ab, das nach Umkristallisieren aus 60 %igen Alkohol bei raschem Erhitzen bei 200° schmolz. Unter dem Mikroskop waren deutlich rhombische Prismen sichtbar. Das Mannosehydrazon zeigt nun denselben Schmelzpunkt, es ist auch das einzige, welches in der Kälte ausfällt. Auch kristallisiert es in rhombischen Prismen. Wir haben nun aus Mannose das Hydrazon dargestellt; dieses zeigte einen Schmelzpunkt von 199°. Der Mischschmelzpunkt des aus Eiweiß erhaltenen und des aus Mannose dargestellten Hydrazons lag bei 199°, so daß die Identität erwiesen erscheint.

Wir haben nun versucht, einen anderen Eiweißkörper in den Bereich unserer Untersuchung zu ziehen, und zwar das Dotteralbumin aus Hühnerdotter, welches bereits *Carl Neuberg* nach einer anderen Richtung studiert hatte. Wir hatten ein größeres Quantum Dotteralbumin von Lecithindarstellungen in Händen und verdauten es tryptisch in oben beschriebener Weise. Die filtrierte Lösung wurde vorerst mit Wasserdampf von dem gelösten Chloroform und Toluol befreit, hierauf mit Bleiacetat und Ammoniak gefällt, der Bleiniederschlag gewaschen, in Essigsäure gelöst, vom ungelösten Anteil abfiltriert und wieder mit Ammoniak gefällt und sehr gründlich gewaschen. Diesen Vorgang haben wir wiederholt. *Dadurch konnten wir nun das Verfahren sehr vereinfachen.* Der Bleiniederschlag wurde in wässeriger Suspension mit Kohlensäure zerlegt, das Filtrat im Wasserstoffstrom und Vakuum immer stärker eingeengt und vom ausgeschiedenen Blei abfiltriert. Die letzten Spuren Blei wurden mit wenig Schwefelwasserstoff entfernt und die stark konzentrierte Lösung in ein größeres Volumen

absoluten Methylalkohols eingerührt. Die methylalkoholische Lösung wird abfiltriert, der Niederschlag in möglichst wenig Wasser gelöst; es scheiden sich schwer lösliche Substanzen ab, von denen man abfiltriert, man fällt wieder mit sehr viel Methylalkohol, wäscht den Niederschlag mit absolutem Methylalkohol aus, dann mit Äther, trocknet ihn im Vakuum. Die methylalkoholischen Mutterlaugen wurden vereinigt und sehr stark eingeengt. In der Kälte scheiden sich auch hier unlösliche Verbindungen ab, von denen man abfiltriert. Das Filtrat gibt mit wässeriger konzentrierter Sublimatlösung eine Fällung, von der man am nächsten Tage abfiltriert, nun fällt man wieder mit Methylalkohol und erhält eine neue Portion einer schneeweißen kristallinischen Verbindung. Engt man wieder die methylalkoholische Mutterlauge ein, so sieht man die gleiche Erscheinung der Ausscheidung einer unlöslichen Verbindung und kann neuerlich aus dem Filtrate mit Methylalkohol etwas Substanz gewinnen.

Die erhaltene Substanz wurde nun mit Methylalkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Sie zeigt keinen Schmelzpunkt, bräunt sich bei 230° und zersetzt sich bei 250°.

Die Analyse gibt folgende Werte:

4,240 mg Substanz: 6,523 CO_2, 2,444 H_2O, Asche 0,070 (1,65%).
4,660 „ „ 7,203 CO_2, 2,880 H_2O, Asche 0,080 (1,72%).
4,374 „ „ 0,154 ccm N (748 mm, 16°).
4,825 „ „ 0,169 „ N (748 „ , 16°).

Zur Berechnung der Analysen auf aschefreie Substanz wurde wie bei den vorhergehenden Analysen die Asche sofort von der Einwage subtrahiert, ebenso bei den Stickstoffbestimmungen 1,70% abgezogen.

Formel $C_{12}H_{23}NO_{10}$:

Ber.:	C 42,21%	H 6,79%	N 4,10%
Gef.:	C 42,66%	H 6,56%	N 4,16%
	C 42,89%	H 7,04%	N 4,14%

Die Substanz aus Dotteralbumin ist also mit der aus Hühner-Eiweiß erhaltenen identisch.

Auch diese Substanz reduziert Kupferlösung nicht. *Mit Speicheldiastase kann man aus ihr eine reduzierende Substanz erhalten.* Sodann zerlegten wir 2 g der Substanz durch Kochen mit 20% Salzsäure. Die erhaltene Lösung wird neutralisiert und mit Natriumacetat und Phenylhydrazinacetat im Überschuß versetzt. Sofort fällt das Hydrazon in farblosen Kristallen aus und wird aus 60%igem Alkohol umkristallisiert. Der Schmelzpunkt ist 198°. Die Stickstoffbestimmung erwies die Identität mit Hexosephenylhydrazon:

4,610 mg Substanz: 0,419 ccm N (748 mm, 14°).

Hexosephenylhydrazon, Formel $C_{12}H_{18}O_5N_2$:

Ber.: N 10,37%
Gef.: N 10,64%

Im Filtrat vom Mannose-Phenylhydrazon suchten wir nun das Osazon des Glucosamins zu isolieren. Zu diesem Zwecke fügten wir noch essigsaures Phenylhydrazin hinzu und erwärmten 1 Stunde im siedenden Wasserbad. Die ausgefallenen gelben Kristalle wurden abgenutscht und aus Essigsäure umkristallisiert; sie schmolzen bei 204°. Der Körper ist also mit dem Osazon, das man aus Glucosamin erhalten kann, identisch.

Wir haben also eine Glucosamino-Mannose-Biose vor uns oder ein Polymeres dieser Biose. Auffällig ist, daß auch die durch Verdauung erhaltene Biose die Ebene des polarisierten Lichtes nicht dreht. Während Maltose und Lactose reduzieren, scheint die hier gefundene Glucosamin-Mannose eher nach dem Typus der nicht reduzierenden Saccharose zusammengesetzt zu sein. Auffällig ist ferner die neutrale Reaktion des Aminozuckers, so daß die Aminogruppe als solche in der Biose nicht existent zu sein scheint und erst bei der Hydrolyse auftritt. Um dieses Verhalten festzustellen, haben wir die Aminogruppe nach *van Slyke* zu bestimmen versucht.

Wir schüttelten 1 g Substanz durch eine halbe Stunde mit einer konzentrierten Natriumnitritlösung und Essigsäure im van-Slyke-Apparat, erhielten jedoch *keinen Stickstoff*.

Der negative Ausfall der Aminostickstoffbestimmung nach *van Slyke* beweist unsere Annahme, daß die Aminogruppe als solche nicht existent ist und erst bei der Hydrolyse manifest wird. Es ist also die Aminogruppe des Glucosamins mit der Mannose verbunden.

Durch den Nachweis der Mannose ist nun erklärt, warum das Eiweiß zum Unterschiede vom Chitin die α-Naphtholreaktion gibt.

Es ist auch zum ersten Male gezeigt worden, daß die Mannose, welche man sonst nur in Pflanzen-Polysacchariden vorfindet, am Aufbau des tierischen Organismus teilnimmt, so daß also im tierischen Organismus noch eine dritte Aldohexose gefunden wurde: die Mannose neben der früher gefundenen Glucose und Galactose.

Zur Methodik der Mikrobestimmung des Zuckers im Blute nach Hagedorn-Jensen.

Von

E. Martinson.

(Aus der Biochemischen Abteilung des Institutes für experimentelle Medizin zu Leningrad.)

(Eingegangen am 12. April 1927.)

Bei meinen Untersuchungen, welche die Wirkung einiger Faktoren auf den Zuckergehalt im Blute betreffen, habe ich beobachtet und beobachte auch jetzt sehr geringe, aber gesetzmäßig sich wiederholende Veränderungen in seinem Gehalt. Oft übersteigen sie nicht 4 bis 5%.

Die Methode *Hagedorn-Jensen*, deren ich mich bediene, ergibt, wie die Autoren[1][2]) selbst angeben, eine Abweichung der Bestimmung bis 4%, d. h. genau in den Grenzen, in welchen manchmal die von mir beobachteten Schwankungen lagen, und ich würde ihnen natürlich keine Bedeutung zuschreiben, wenn sie nicht, wie ich schon erwähnte, den Charakter einer Gesetzmäßigkeit trügen; daher beschloß ich zu bestimmen, welche Schwankungen diese Methode in meinen Händen bei parallelen Bestimmungen ergibt.

In die Methode selbst habe ich keine Veränderungen eingeführt, sondern ich habe meine Aufmerksamkeit auf die Genauigkeit der Abmessung der K_3FeCy_6-Lösung gelenkt, richtiger gesagt, auf die Vollständigkeit der Übertragung der mit einer Pipette abgemessenen Menge in das Reaktionsgemisch.

Deswegen hielt ich es vor allen Dingen für notwendig, zu erforschen, wie man die abgemessene Lösung aus der Pipette ausgießen muß, um sicher zu sein, daß die ganze abgemessene Menge vollständig aus derselben herausgeflossen ist. Ich gebrauchte dabei eine Pipette von 2 ccm, geteilt auf 0,01 ccm.

---

[1]) Diese Zeitschr. 135, 46, 1923.

[2]) Ebendaselbst 137, 92, 1923.

Nachdem ich genau 2 ccm der K_3FeCy_6-Lösung abgemessen hatte, ließ ich die Flüssigkeit aus der Pipette in das Probierglas ausfließen, blies sie leicht aus und befestigte sie in einer vertikalen Lage, um zu beobachten, wieviel Lösung noch in gewissen Zeiträumen ausfließen wird.

Vielfache Beobachtungen, die ich in dieser Richtung gemacht habe, zeigten mir, daß zum vollständigen Ausfließen der K_3FeCy_6-Lösung von den Innenwänden der Pipette 5 Minuten erforderlich sind. Nach 5 Minuten beobachtet man manchmal weiteres Ausfließen, aber in einer so geringen Menge, daß dieselbe, wie ich mich vielfach überzeugt habe, keinen Einfluß auf die Resultate der Titration haben soll. In der Tabelle I sind die Resultate der oben erwähnten Beobachtungen angeführt.

Tabelle I.

Beobachtungszeit Min.	Menge der von den Wänden der Pipette nachträglich ausgeflossenen Lösung nach dem ersten Entleeren bei angegebener Beobachtungszeit ccm
1	0,001
2	0,002
3	0,003
4	0,035
5	0,04
6	nichts oder eine ganz unbeträchtliche Menge

Außerdem habe ich eine Reihe von Beobachtungen gemacht, in welchen ich titrierte: 1. unmittelbar nach der Entleerung der Pipette und 2. nach Verlauf von 1, 2, 3, 4, 5 Minuten. Mittelresultate sind in der Tabelle II angegeben. In der dritten Spalte derselben sind die Resultate der ergänzenden Titration angegeben. Diese letzten Zahlen sind auf folgende Weise erreicht: bei der Titration sofort nach dem Auslassen der K_3FeCy_6-Lösung aus der Pipette oder nach Abwarten im Laufe von 1 bis 5 Minuten mit nachfolgendem Ausblasen der an der

Tabelle II.

1 ccm K_3FeCy_6 entspricht 0.995 ccm 0,005 n $Na_2S_2O_3$.

Zeit Min.	Resultate der ersten Titration	Resultate der zweiten ergänzenden Titration	Summe von zwei Titrationen
Leichtes Ausblasen	1.95 ccm $Na_2S_2O_3$	0.04 ccm $Na_2S_2O_3$	1.99
1	1.97 „ „	0.02 „ „	1.99
2	1.98 „ „	0.01 „ „	1.99
3	1.985 „ „	0.005 „ „	1.99
5	1.99 „ „	0.000 „ „	1.99

Spitze der Pipette angesammelten Lösung in das Reaktionsgemisch brachte ich die Pipette in eine vertikale Lage und wartete so viel Zeit ab, damit im ganzen auf das Ausfließen 5 Minuten kamen. In dem Versuch also, wo Titration nach 3 Minuten vom Beginn des Ausfließens der Lösung geschah, hing ich die Pipette auf 2 Minuten auf, blies das Angesammelte aus und titrierte nachträglich, und dergleichen.

Für das vollständige Abfließen der Lösung im Verlauf von 5 Minuten spricht schließlich noch folgendes Experiment. Es wurden 2 ccm K_3FeCy_6-Lösung in das Probierglas abgemessen und eben dahin nach 5 Minuten der Rest der Lösung hineingeblasen. Nach Hinzufügung der entsprechenden Reagenzien wurde mit 0,005 n $Na_2S_2O_3$-Lösung titriert. Bei der Titration wurden 1,99 ccm verbraucht. In das andere Probierglas wurden ebenso 2 ccm der K_3FeCy_6-Lösung zugegossen, nachdem die Pipette ausgespült und das Spülwasser ebenso zur gesamten Mischlösung zugefügt wurde. Bei der Titration wurden in diesem Falle ebenso 1,99 ccm 0,005 n $Na_2S_2O_3$ verbraucht.

Auf Grund der oben angeführten Beobachtungen habe ich als Regel angenommen, in allen Bestimmungen nach dem Ausfließen der abgemessenen K_3FeCy_6-Menge aus der Pipette in das Probierglas noch 5 Minuten zu warten, bis das vollständige Ausfließen der Lösung von den Wänden geschieht, wonach ich die angesammelte Flüssigkeit hinzufügte. Um die Größe der Schwankungen in parallelen Bestimmungen festzustellen, habe ich eine Serie von Doppelanalysen in zwölf einzelnen Portionen des bei einem Hunde zu verschiedenen Zeiten entnommenen Oxalatblutes gemacht.

Die Methodik der Blutentnahme war folgende: Das Blut wurde aus einem Ohre, welches vorher rasiert wurde, genommen. Zu diesem Zweck wurde mit einem Skalpell ein Längsschnitt des Randgefäßes von einigen Millimetern Länge gemacht.

Diese Stelle des Schnittes wurde mit einer kleinen Druckpinzette zugedrückt, wobei man bei Entfernung derselben zu beliebiger Zeit Blut entnehmen konnte. Ich entnahm jedesmal gegen 10 Tropfen Blut in ein breites Probierglas mit einer geringen Menge zu Pulver zerriebenen Kalii oxalici. Zur Analyse wurde das Blut aus einem Probierglas mit einer Mikropipette von 0,1 ccm genommen. Nach dem Entnehmen des Blutes für die erste Analyse wurde die Pipette mit einer Lösung von Kalii oxalici und danach noch einmal mit dem zu untersuchenden Blute gespült. Danach wurde sofort das Blut für die zweite Analyse abgemessen.

Auf diese Weise hat man die Möglichkeit, sich nur einer Pipette zu bedienen, da es nicht notwendig ist, zu warten, bis die Pipette nach ihrer Spülung im Wasser oder in Kaliumoxalat-Lösung austrocknet.

Der Zeitraum zwischen dem Entnehmen des Blutes für zwei parallele Bestimmungen übersteigt dabei nicht 5 Minuten.

Die Resultate der Parallelanalysen sind in der Tabelle III angeführt.

Tabelle III.

Nr. der Analyse											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Erste Bestimmung.											
0,087	0,095	0,092	0,087	0,095	0,084	0,095	0,097	0,084	0,085	0,092	0,097
Zweite Bestimmung.											
0,087	0,095	0,090	0,088	0,095	0,083	0,095	0,095	0,085	0,083	0,090	0,095
Differenz von zwei Bestimmungen.											
0	0	0,002	0,001	0	0,001	0	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002

Wie zu ersehen, ist nur in fünf von zwölf Fällen die Differenz zwischen den Parallelbestimmungen für das gegebene Blut gleich 2 mg auf 100 ccm Blut, was ungefähr 2% der ganzen Zuckermenge ausmacht. Für die übrigen sieben Fälle macht die Differenz zwischen den Parallelbestimmungen weniger als 2% der Zuckermenge, die zu bestimmen ist, aus.

Außerdem war es von Interesse, festzustellen, welch eine allerkleinste Veränderung in dem Zuckergehalt durch diese Methode notiert werden kann. Dazu wurde 1 g Glucose in 1 Liter Wasser aufgelöst, von dieser Lösung wurden genau 10 ccm abgemessen und mit Wasser bis 100 ccm verdünnt. Auf diese Weise wurde eine Lösung gewonnen, welche in 1 ccm 0,1 mg Glucose enthielt. Von dieser Lösung wurde 1 ccm in jedes von 13 Probiergläsern genommen, zu fünf von ihnen wurde später mit Hilfe der Mikropipette 0,01 ccm derselben Lösung hinzugefügt, d. h. zu 0,001 mg Glucose.

In allen 13 Proben wurde die Zuckermenge festgestellt, wobei die Bestimmung so geschah, als ob es Blut wäre, d. h. es wurde schwefelsaures Zink und Natronlauge hinzugefügt, nach der Erwärmung in einem Wasserbad wurde die Lösung filtriert usw.

In der Tabelle IV werden die Resultate der Bestimmungen angegeben.

Tabelle IV.

Zuckergehalt mg	Die gefundene Zuckermenge								Mittelwert
0,100	0,100	0,101	0,101	0,101	0,101	0,101	0,102	0,102	0,101
0,101	0,102	0,102	0,102	0,102	0,103	—	—	—	0,102

Auf diese Weise ergibt die Methode *Hagedorn-Jensen* bei Beachtung der oben angeführten Bedingungen bei dem Entnehmen der K_3FeCy_6-Lösung niedrigere Fehlerprozente als die Autoren es selbst zulassen.

Ich meine, es hängt gerade von einer genaueren und gleichmäßig vollständigen Zufügung von K_3FeCy_6 in allen Analysen ab. Aus der Tabelle III sieht man, daß sogar beim Abwarten im Laufe von 1 Minute bei der Titration noch ein Fehler von 0,02 ccm der Lösung von 0,005 n $Na_2S_2O_3$ eintritt, was 0,004 mg Zucker entspricht. Ich aber titrierte mit einer Genauigkeit von nicht weniger als 0,005 ccm und notiere somit eine Differenz von 0,001 mg Zucker.

Dabei benutzte ich eine leicht und einfach herzustellende Mikrobürette. Die Pipette von 2 ccm mit Teilung auf 0,01 ccm wird mittels einer in der volumetrischen Analyse gebräuchlichen Syphonvorrichtung mit einer Flasche von 2 Liter Inhalt, in welche die 0,005 n $Na_2S_2O_3$-Lösung gegossen wird, verbunden. Auf die Lösung wird eine dichte Schicht von Paraffinum liquidum gegossen. Außerdem wird in den Pfropfen eine Röhre mit Natronkalk und Natronlauge gestellt. Eine auf diese Weise aufbewahrte 0,005 n $Na_2S_2O_3$-Lösung verändert im Laufe von einigen Monaten ihren Titer nicht. Das Arbeiten mit einer solchen Mikrobürette ist sehr bequem, wie ich mich davon im Laufe mehrerer Jahre überzeugt habe.

Vermittelst einer gläsernen, speziell ausgewählten Röhre mit entsprechend dünnem Ende kann man mit einer Genauigkeit von nicht weniger als bis 0,005 ccm titrieren.

Vor dem Beginn der Titration werden vorsichtshalber ungefähr 10 ccm der Lösung aus der Mikrobürette ausgegossen, d. h. ungefähr die Menge, welche sich in den Verbindungsröhren befindet, weil manchmal eine leichte Veränderung des Titers gerade in diesen Teilen bemerkt wird.

Zusammenfassung.

Die Zuckerbestimmung nach der Methode *Hagedorn-Jensen* kann unter Beachtung gewisser Bedingungen mit einem Fehler nicht über 2% ausgeführt werden.

Um mit solcher Genauigkeit arbeiten zu können, ist es notwendig, bei Zufügung von K_3FeCy_6 entweder das vollständige Abfließen der Lösung von den Wänden der Pipette im Laufe von 5 Minuten abzuwarten oder jedesmal die Pipette mit Wasser zu spülen.

Wenn solch eine Genauigkeit nicht erforderlich ist, kann man zur Beschleunigung der Arbeit sich mit 1 Minute Wartezeit begnügen.

Zur Kenntnis des Jods als biogenes Element.

X. Mitteilung[1]):

Untersuchung einiger Kulturpflanzen auf ihren natürlichen Jodgehalt und dessen Steigerung durch Joddüngung.

Von

K. Scharrer und J. Schwaibold.

(Aus dem Agrikulturchemischen Institut der Hochschule für Landwirtschaft und Brauerei Weihenstephan bei München.)

(Eingegangen am 13. April 1927.)

A. Einleitung.

Obwohl schon vor etwa 70 Jahren vorzüglich von *Chatin* (1), wenn auch vielfach angezweifelt, durch ausgedehnte Untersuchungen dargetan worden war, daß die Substanz nahezu aller untersuchten Pflanzen und Tiere Jod führt, konnte es doch geschehen, daß diese Tatsache vielfach vollkommen in Vergessenheit geriet, da das Ausbleiben weiterer systematischer Untersuchungen in dieser Richtung verhinderte, diese Arbeiten zur allgemeinen Kenntnis und Anerkennung gelangen zu lassen. So war es möglich, daß fünf Jahrzehnte später der Theorie, die Tätigkeit der Schilddrüse sei als eine Befreiung der Körpersäfte von toxischen Produkten des Stoffwechsels anzusehen, längere Zeit eine Bedeutung zuerkannt wurde, die sich heute auf Grund erweiterter Erkenntnis fast ausschließlich anderen Anschauungen zugewandt hat.

Es war eine hauptsächliche Stütze dieser Theorie, daß bei halogenfreier Fütterung die Schilddrüse der Versuchstiere noch nach Monaten einen beträchtlichen Jodvorrat enthielt, woraus man dann glaubte, schließen zu

---

[1]) Vgl. I. Mitteilung: diese Zeitschr. **170**, 265, 1926; II. Mitteilung: ebendaselbst **170**, 277, 1926; III. Mitteilung: ebendaselbst **170**, 300, 1926; IV. Mitteilung: ebendaselbst **178**, 161, 1926; V. Mitteilung: ebendaselbst **180**, 300, 1927; VI. Mitteilung: ebendaselbst **180**, 307, 1927; VII. Mitteilung: ebendaselbst **180**, 313, 1927; VIII. Mitteilung: ebendaselbst **180**, 334, 1927; IX. Mitteilung: ebendaselbst **182**, 291, 1927.

dürfen, daß das Jod bei den verschiedensten Umsetzungen zur oxydativen Entgiftung der Körperflüssigkeiten ständig in der Schilddrüse verbleibe. Daß ein solches dauerndes Verbleiben ein- und desselben Stoffes in der Drüse, zumal bei ständiger Inanspruchnahme, den gesicherten und grundsätzlichen Anschauungen über die Energetik des Stoffwechsels widerspricht, möge hier nur angedeutet sein. Wir dürfen aber wohl heute die von *Blum* (2), dem Vertreter der Entgiftungshypothese, behauptete Halogenfreiheit des Versuchsfutters wenigstens bezüglich des Jods als irrig annehmen. Die neuesten Forschungsergebnisse auf Grund der Untersuchungen von *B. Bleyer* (3), *Th. v. Fellenberg* (4), *J. Stoklasa* (5) und anderen haben die allgemeine Verbreitung des Jods in der Pflanzen- und Tierwelt sichergestellt. Daraufhin ist nun die Frage nach den quantitativen Verhältnissen in den Vordergrund getreten. Hierzu mögen die von uns an einigen wichtigen Nutzpflanzen auf charakteristischen Bodenarten durchgeführten Kulturversuche und deren analytische Auswertung einen Beitrag liefern.

Die Ergebnisse physiologischer Forschungen haben die Notwendigkeit einer dauernden Zufuhr gewisser Jodmengen in der Ernährung von Mensch und Tier wahrscheinlich gemacht. Als ein natürlicher Vermittler dieser Zufuhr erscheint die zur Ernährung dienende Pflanze. Diese Anschauung hat nun schon verschiedene Forscher, z. B. *Th. v. Fellenberg* (4), *J. Stoklasa* (5), *E. Hiltner* und *M. Bergold* (6) veranlaßt, Versuche darüber anzustellen, ob es möglich wäre, durch Zugabe anorganischer Jodverbindungen in den Boden die darauf wachsenden Pflanzen zu einer erhöhten Jodassimilation zu veranlassen. Wir haben unter systematisch abgestufter Joddüngung an denselben Kulturpflanzen, die ebenfalls bei den Vegetationsversuchen auf natürlichem Boden (ohne Jodgabe) gewählt wurden, auch in dieser Hinsicht Untersuchungen vorgenommen, über die im nachstehenden kurz berichtet werden soll.

B. Die Versuche.

1. Joddüngungsversuche in Vegetationsgefäßen an verschiedenen Pflanzen.

Diese Versuche wurden in Tongefäßen ausgeführt, je Düngungsart in vier Vergleichsgefäßen. Als Bodenart diente ein Sandboden aus der Miocänstufe des Tertiärs. Die Bodenmenge war 5 kg je Gefäß.

Die Nährstoffanalyse des heißen konzentrierten Salzsäureauszugs vom wasserfreien Feinboden ergab:

N	0,046 %
P_2O_5	0,064 %
K_2O	0,102 %
CaO	0,140 %
MgO	0,190 %

Die Reaktion des Bodens war neutral, $p_H = 6,57$.

Der Jodgehalt des HCl-Auszugs (in Salzsäure von 1 : 1 nach einstündiger Einwirkung) wurde mit 10 γ in 100 g lufttrockenem Boden festgestellt; das in Salzsäure unlösliche Jod zu 130 γ.

Die Schlämmanalyse nach *Kopecky*[1]) zeigte folgendes Ergebnis:

1. Sand	2 bis 0,1 mm	=	88,50%
2. Feinsand	0,1 „ 0,05 „	=	6,20%
3. Staub	0,05 „ 0,01 „	=	2,80%
4. Feinstes	< 0,01 „	=	2,50%

Versuchsplan: 1. Volldüngung mit N, P_2O_5 und K_2O *ohne* Jod.
2. „ + Jod einfache Gabe.
3. „ + Jod zweifache Gabe.

Düngung je Gefäß: 2,0 g N in Form von schwefelsaurem Ammoniak,
2,0 g P_2O_5 in Form von Rhenaniaphosphat,
2,0 g K_2O in Form von 40%igem Kalisalz.

Die Jodzufuhr belief sich in der einfachen Gabe auf 0,5 mg J, in der doppelten Gabe auf 1,0 mg je Gefäß in Form von KJ.

An Pflanzen wurden angebaut:

1. Sommergerste (Hordeum distichum).
2. Hafer (Avena sativa).
3. Viktoriaerbsen (Pisum sativum).
4. Luzerne (Medicago sativa).
5. Rotklee (Trifolium pratense).
6. Wiesenhafer (Avena elatior).
7. Wiesenfuchsschwanz (Alopecurus pratensis).

Sämtliche Pflanzen wurden entsprechend ihrer Eigenart gesät, während der Vegetation bearbeitet und nach der Reife bzw. die Gräser und Kleearten mit Beginn der Blüte geerntet.

Die Analysenergebnisse gibt Tabelle I wieder.

Tabelle I.

Jodgehalte der Ernteprodukte von Topfdüngungsversuchen, J in γ-% Trockensubstanz.

Pflanze	Normal	0,5 mg J je Versuchsgefäß	1,0 mg J je Versuchsgefäß
Rotklee	63	125	200
Wiesenhafer	75	450	990
Wiesenfuchsschwanz	57	90	125
Hafer, Samen	13	19	32
Hafer, Stroh	36	60	205
Erbsen, Samen	11	15	24
Erbsen, Stroh	61	250	260
Luzerne	56	130	575
Sommergerste, Samen	9	24	22
Sommergerste, Stroh	95	150	280

Die Untersuchung des Miocänsandbodens ergab, wie schon erwähnt, einen Gehalt an löslichem Jod von 10 γ-%, an unlöslichem Jod von 130 γ-%.

[1]) *J. Kopecky,* Die Bodenuntersuchung zum Zwecke der Drainagearbeiten mit besonderer Berücksichtigung der Ausführung mechanischer Bodenanalysen mittels eines neuen kombinierten Schlämmapparats. Prag 1901.

Es darf also eine den Normalpflanzen zur Verfügung stehende Menge von höchstens 500 γ J für diese Vegetationsperiode angenommen werden neben etwa 6500 γ festgebundenem. Dazu kommt die durch die Atmosphäre (Luft, Tau, Regen) sich bietende Jodmenge, deren Aufnahme durch die Pflanze sich aber nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung kaum annähernd abschätzen läßt. Es ist nur ein Bruchteil dieser Menge von den Pflanzen aufgenommen worden, wie aus der Zahlenreihe „Normal" der Tabelle I zu ersehen ist.

Den Pflanzen mit 0,5 mg J je Versuchsgefäß als Jodgabe (Tabelle I) standen außer dem natürlichen Bodenvorrat noch 500 γ J zur Verfügung. Man beobachtet eine erhebliche Steigerung des durch die Pflanzen assimilierten Jods, welche in weiten Grenzen schwankt, wobei der Wiesenhafer eine Höchstmenge aufweist; ferner zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Jodgehalt zwischen dem Stroh von Gerste, Hafer und Erbsen und deren Samen, welche viel weniger Jod enthalten als das Stroh.

Durch die Jodgabe von 1,0 mg je Versuchsgefäß wurde eine Jodanreicherung in den Pflanzen erzielt, die bei der doppelten Gabe sich meistens höher hielt als bei der einfachen. Wiederum zeigten die Samen von Hafer, Gerste und Erbsen bedeutend geringere absolute Werte als das entsprechende Stroh.

2. *Joddüngungsversuch an Spinat auf Freiland.*

Der Versuchsboden war ein schwerer Decklehm des dem Tertiärgebiet angehörigen Weihenstephaner Hügellandes, dessen Zusammensetzung, bezogen auf wasserfreien Feinboden (heißer, konzentrierter Salzsäureauszug), durch folgende Zahlen wiedergegeben wird:

N	0,198%
P_2O_5	0,168%
K_2O	0,268%
CaO	0,170%
MgO	0,091%

Reaktion schwach sauer, $p_H = 5{,}45$.

Die Untersuchung des Bodens ergab einen Gehalt desselben an löslichem Jod (durch HCl 1 : 1 nach 1 Stunde) von etwa 35 γ-%, an unlöslichem Jod von etwa 400 γ-%.

Der Versuch wurde eigens zu dem Zwecke durchgeführt, um die Jodaufnahme der Pflanzen zu studieren; aus diesem Grunde wurde auch von einer Differenzierung der Jodgaben abgesehen.

Der Spinat erhielt lediglich eine sehr gute Volldüngung von 132 kg N je Hektar als Natronsalpeter in drei Gaben am 24. April, 15. Mai und 9. Juni, von 60 kg P_2O_5 je Hektar als Superphosphat und von 100 kg je Hektar als 40%iges Kalisalz, beide am 24. April.

Am 26. April 1926 erfolgte die Saat. Erst als der Spinat schon vollkommen schnittreif war, wurde entsprechend dem Versuchsgedanken das Jod am 9. Juni in einer Höhe von 0,080 g J je Quadratmeter oder von 800 g je Hektar in Form von KJ gereicht und vom 11. Juni ab in mehr-

tägigen Abständen 13 Ernten staffelweise entnommen. Diese Teilernten wurden dann getrennt auf ihren Jodgehalt untersucht. Die gleiche Fläche Spinat blieb als „Normalspinat" ohne Jodzufuhr und wurde im nämlichen Turnus geerntet wie der Jodspinat.

Die Ergebnisse der Untersuchungen finden sich in Tabelle II.

Tabelle II.

Jodgehalt von Spinat aus Freilanddüngungsversuchen in γ-% Trockensubstanz.

Datum der Probenahme 1926	Ohne Jod	Jodgedüngt*)	Tage seit der Joddüngung
11. VI. . .	230	2200	2
14. VI. . .	270	2330	5
15. VI. . .	300	2840	6
16. VI. . .	345	3070	7
17. VI. . .	330	3460	8
21. VI. . .	345	—	12
22. VI. . .	300	2170	13
23. VI. . .	280	2780	14
24. VI. . .	195	2070	15
25. VI. . .	265	1600	16
28. VI. . .	185	—	19
30. VI. . .	177	—	21
1. VII. . .	160	1560	22

*) Joddüngung 8,0 g Jod als Jodkalium je ar.

Bei der Versuchsreihe mit Joddüngung wurden somit dem Kilogramm Boden außer etwa 350 γ an im Boden sich befindlichem, in HCl-löslichem, natürlichem Jod noch 267 γ J zugeführt[1]). Wie aus der entsprechenden Spalte der Tabelle II zu ersehen ist, hatte dieser Umstand eine außerordentliche Jodspeicherung durch die Versuchspflanzen zur Folge.

3. Joddüngungsversuch zu Zuckerrüben auf Freiland.

Dieser Versuch wurde auf dem Versuchsfeld des Instituts im Jahre 1924/25 als Felddüngungsversuch zu Zuckerrüben eingeleitet.

Der Versuchsboden war der gleiche wie der im Versuch 2 beschriebene, nämlich ein schwerer Decklehm des dem Tertiärgebiet angehörigen Weihenstephaner Hügellandes von der bereits oben geschilderten Zusammensetzung.

Als Frucht wurden Zuckerrüben (Beta vulgaris) Sorte Kleine Wanzlebener, angebaut.

---

[1]) Bei einem spezifischen Gewicht des Bodens von 1,5 und einer Krumentiefe von 20 cm.



Zur Beantwortung der Fragestellung des Versuchs wurde folgender Versuchsplan gewählt:

1.	Grunddüngung		
2.	„	+ Natronsalpeter	
3.	„	+ Chilesalpeter	
4.	„	+ Natronsalpeter	+ 0,03 % J[1])
5.	„	+ „	+ 0,09 % J
6.	„	+ „	+ 0,2 % J
7.	„	+ „	+ 0,3 % J
8.	„	+ Chilesalpeter	+ 0,03 % J[1])
9.	„	+ „	+ 0,09 % J
10.	„	+ „	+ 0,2 % J
11.	„	+ „	+ 0,3 % J

Die Zahl der Kontrollparzellen war 5 je Düngungsart, die Größe der Teilstücke je ¼ Ar.

Als Grunddüngung wurden 150 kg P_2O_5 und 160 kg K_2O je Hektar verabreicht, und zwar die Phosphorsäure als Rhenaniaphosphat, das Kali als 40%iges Kalisalz, beide am 7. April.

Der Stickstoff wurde in einer Höhe von 132 kg je Hektar einerseits als synthetischer Natronsalpeter, andererseits als Chilesalpeter in drei Abschnitten am 7. April, 7. Mai und 27. Mai gegeben.

Der Durchschnitt der jeweiligen Gaben an Natronsalpeter und Chilesalpeter belief sich demnach auf 837 kg je Hektar. Auf diese 837 kg Natron- bzw. Chilesalpeter sind nun die im Versuchsplan erwähnten Prozente der Jodzufuhr zu beziehen. Es kamen somit an Jod in Form von $NaJO_3$ zur Anwendung:

bei 0,03 %	Jod	0,628 g	Jod je Teilstück zu	¼ Ar	oder	0,251 kg	Jod je Hektar
„ 0,09 %	„	1,883 g	„ „ „ „	¼ „	„	0,753	„ „ „ „
„ 0,2 %	„	4,185 g	„ „ „ „	¼ „	„	1,674	„ „ „ „
„ 0,3 %	„	6,278 g	„ „ „ „	¼ „	„	2,511	„ „ „ „

Da der verwendete Chilesalpeter einen Gehalt von 0,027 g Jod je Kilogramm hatte, wurden mit ihm den reinen Chilesalpeterparzellen je Teilstück zu ¼ Ar 0,057 g Jod oder je Hektar 22,599 g Jod zugeführt. Außerdem sind diese Mengen Jod des Chilesalpeters der sonstigen Jodgabe auf den Parzellen „Chilesalpeter + Jod" zuzuzählen.

Das Jod wurde als $NaJO_3$ in zwei Gaben, die eine Hälfte am 7. Mai, die zweite Hälfte am 27. Mai des betreffenden Teilstückes zusammen mit der zweiten und dritten Stickstoffdüngung gegeben, indem die entsprechenden Jodmengen in destilliertem Wasser aufgelöst und diese Lösung den stark getrockneten Stickstoffsalzen zugemischt wurden. Trotz dieses Vorganges waren Natron- und Chilesalpeter noch gut streubar.

Der Versuchsschlag wurde am 7. April mit einer Sternwalze gewalzt, zweimal tief kultiviert, geeggt und hierauf die Saat der Zuckerrüben mit einer Reihenentfernung von 40 cm und einer Saatstärke von 30 kg je Hektar vorgenommen. Das Auflaufen erfolgte am 23. April sehr gleichmäßig. Die weitere Bearbeitung bestand in einem leichten Walzenstrich am 6. Mai,

---

[1]) Entspricht ungefähr der zehnfachen Menge des Jods im verwendeten Chilesalpeter.

in dem Verziehen der Rüben am 27. Mai auf 40 cm innerhalb der Reihe und in vier Hacken am 8. Mai, 29. Mai, 6. Juni und 15. Juni.

Die Zuckerrüben entwickelten sich im Laufe der Vegetationszeit sehr gut. Die Ernte fand am 9. und 10. Oktober statt.

Behufs Analyse auf Jod wurden sowohl Bodenproben am 22. Oktober 1925, als auch Proben der Ernteprodukte nach der Ernte den einzelnen Parzellen entnommen.

Die Böden sämtlicher Parzellengruppen wurden nach Beendigung des Versuchs auf ihren Jodgehalt untersucht, und zwar jeweils eine Probe einer einzelnen Parzelle jeder Gruppe und einer Mischung der Proben der einzelnen Parzellengruppen. Die Probeentnahme geschah am 22. Oktober 1925 in der Weise, daß an zehn Stellen jeder Parzelle in gleichmäßiger Verteilung über dieselbe ein Spaten voll Erde 20 cm tief entnommen, diese Menge gut durchgemischt und hiervon an möglichst vielen Stellen zusammen etwa 1 kg als Untersuchungsmaterial gewählt wurde.

Betrachtet man die in Tabelle III wiedergegebenen Analysenergebnisse, so ist zwar selbstverständlich keine Proportionalität zwischen Düngungsgabe und Jodgehalt der Böden zu beobachten; jedoch kann man ein Ansteigen der Jodmenge der Böden bei höheren Joddüngungsgaben deutlich sehen. Irgendwelche Proportionalität war übrigens weder aus theoretischen noch praktischen Gründen zu erwarten, um so weniger, als das betreffende Vegetationsjahr sehr reiche Niederschläge hatte und die Entnahme der Bodenproben erst nach der Ernte, also nach Ablauf der Vegetationszeit, erfolgte.

Tabelle III.

Jodgehalt der Böden von Freilanddüngungsversuch zu Zuckerrüben.

Nr.	I γ·%	II γ·%	III γ·%	IV γ·%	V g·%	VI g·%
1	25	35	410	370	2,95	4,54
2	35	23	295	230	2,30	3,50
3	25	35	320	330	3,06	3,07
4	30	40	300	330	3,12	2,80
5	50	70	450	1250	3,86	3,82
6	85	190	650	550	3,19	3,35
7	42	47	340	570	3,39	3,28
8	36	60	390	580	3,40	3,60
9	38	45	310	440	2,96	3,20
10	108	48	480	460	3,30	3,07
11	120	103	620	390	2,53	2,32

I. Jodgehalt des HCl-Auszuges berechnet auf 100 g Boden von Einzelparzellen in γ.
II. Jodgehalt des HCl-Auszuges berechnet auf 100 g Boden von Probengemischen der versuchsgleichen Parzellen (jeweils 5) in γ.
III. Jodgehalt des ungelösten Bodenrestes berechnet auf 100 g Gesamtboden der unter I angeführten Proben in γ.
IV. Jodgehalt des ungelösten Bodenrestes berechnet auf 100 g Gesamtboden der unter II angeführten Proben in γ.
V. Menge des HCl-löslichen in 100 g Boden der Proben unter I in g.
VI. Menge des HCl-löslichen in 100 g Boden der Proben unter II in g.

Von dem geernteten Pflanzenmaterial wurden gesonderte Untersuchungen der Blätter und der Wurzel vorgenommen. Die zur Untersuchung gelangten Proben waren Mischungen einer Anzahl Pflanzen jeweils sämtlicher Parzellen einer versuchsgleichen Gruppe. Tabelle IV zeigt das Ergebnis der Untersuchung der Rüben. Diese zeigen einen relativ sehr geringen Jodgehalt der Normalgewächse. Bemerkenswert ist die Abstufung des Jodgehalts der Rübenwurzeln — ausnahmslos fast proportional der Joddüngung —, wobei es scheint, daß die Düngung mit Chilesalpeter teilweise die Ursache einer noch weiteren Erhöhung der Jodierung war.

Tabelle IV.

Jodgehalt der Wurzeln von Zuckerrüben aus Freilanddüngungsversuch.
(Angaben in γ-% Trockensubstanz.)

Grunddüngung				1,4
"	+	Natronsalpeter		0,2
"	+	"	+ 0,03 % J	4,8
"	+	"	+ 0,09 % J	8,8
"	+	"	+ 0,2 % J	9,4
"	+	"	+ 0,3 % J	10,5
"	+	Chilesalpeter		0,3
"	+	"	+ 0,03 % J	5,6
"	+	"	+ 0,09 % J	9,6
"	+	"	+ 0,2 % J	15.0
"	+	"	+ 0,3 % J	28,3

In Tabelle V finden sich die Ergebnisse der Untersuchungen der Blätter. Die Probenahme war die gleiche, wie sie bei den Rüben vorgenommen wurde. Die Blätter führen demnach sehr viel mehr Jod als die Wurzeln; aber auch hier ist eine Jodaufnahme vor sich gegangen, die mit Erhöhung der Jodzufuhr in allen Fällen steigt, wobei in der Reihe mit Chilesalpeter durchweg höhere Werte zu beobachten sind.

Tabelle V.

Jodgehalt der Blätter von Zuckerrüben aus Freilanddüngungsversuch.
(Angaben in γ-% Trockensubstanz.)

Grunddüngung				12,3
"	+	Natronsalpeter		11,0
"	+	"	+ 0,03 % J	16,6
"	+	"	+ 0,09 % J	46,5
"	+	"	+ 0,2 % J	86,0
"	+	"	+ 0,3 % J	193.5
"	+	Chilesalpeter		17,3
"	+	"	+ 0,03 % J	20,3
"	+	"	+ 0,09 % J	58,5
"	+	"	+ 0,2 % J	106,0
"	+	"	+ 0,3 % J	201,0

Die Beobachtung, daß der Jodgehalt der Blätter höher ist als derjenige der Wurzeln, steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Forscher, wie insbesondere *Th. v. Fellenberg* (4), *J. Stoklasa* (5), *E. Hiltner* und *M. Bergold* (6). Auch haben diese bereits beobachtet, daß durch Joddüngung eine erhebliche Steigerung des Jodgehalts der Pflanzenmasse festgestellt werden konnte.

Auf die vor kurzem durch *M. v. Wrangell* (7) erfolgten Angriffe auf den einen von uns (*Scharrer*) und *A. Strobel* wird an anderer Stelle gesondert erwidert werden; dort wird auf den Inhalt der Veröffentlichung *M. v. Wrangells* genauer eingegangen werden, die im wesentlichen behauptet, durch Joddüngung keine Steigerung im Jodgehalt festgestellt zu haben.

Zur weiteren Klärung des Problems Pflanze und Jod sind sowohl auf Freiland als auch in Vegetationsgefäßen ausgedehnte Versuche mit den verschiedensten Böden, insbesondere auch solche aus typischen Kropfgebieten, im Gange. Ferner ist ein größerer Weideversuch zur Lösung der Frage in Durchführung begriffen, inwieweit durch Joddüngung der Weiden eine Jodanreicherung der Gräser und infolge Aufnahme der jodierten Weidepflanzen durch Milchkühe eine Jodanreicherung der Milch bei den weidenden Tieren erfolgt. Weiterhin sollen wichtige Beziehungen zwischen Jod und Boden durch entsprechende Versuche näher studiert werden.

C. Zusammenfassung.

1. An Rotklee, Wiesenhafer, Wiesenfuchsschwanz, Erbsen, Luzerne, Hafer und Sommergerste angestellte Gefäßdüngungsversuche mit Jod unter Verwendung einfacher und doppelter Jodgaben hatten eine deutliche Erhöhung des Jodgehalts zur Folge. Diese Zunahme war bei der doppelten Gabe fast in allen Fällen größer als bei der einfachen.

2. Bei Joddüngungsversuchen an Spinat in Freiland war eine beträchtliche Steigerung des Jodgehalts der mit Jod gedüngten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen festzustellen.

3. Joddüngungsversuche bei Zuckerrüben im Freiland zeigten eine Anreicherung an Jod sowohl in den Wurzeln, als auch insbesondere in den Blättern.

Literatur.

1) Bezüglich dieser und anderer älterer Arbeiten verweisen wir auf *Th. v. Fellenberg*, Ergebn. d. Physiol. **25**, 176, 1926. — 2) Siehe unter anderen *F. Blum*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 160, 1898/99. — 3) *B. Bleyer*, diese Zeitschr. **170**, 265, 1926. — 4) *Th. v. Fellenberg*, Ergebn. d. Physiol. **25**, 176, 1926. — 5) *J. Stoklasa*, diese Zeitschr. **176**, 38, 1926. — 6) *E. Hiltner* und *M. Bergold*, Prakt. Blätter für Pflanzenbau und Pflanzenschutz **8**, 249, 1926. — 7) *M. v. Wrangell*, Die Naturwissenschaften **15**, 70, 1927.



Cholesterinstoffwechsel und reticuloendotheliales System.

Von

F. Goebel und H. Gnoiński.

(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Warschau.)

(Eingegangen am 14. April 1927.)

I.

Obgleich in den letzten Jahren mehrere Untersuchungen über den Cholesterinstoffwechsel bei Säugetieren durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse unklar und sogar widersprechend.

Einige Autoren, darunter *Aschoff* und seine Schule, sind der Meinung, daß der Organismus der Wirbeltiere nicht imstande sei, die Synthese des Cholesterins durchzuführen, so daß die einzige Quelle des Cholesterins in der Nahrungszufuhr zu suchen sei. Die im Cholesterinstoffwechsel hauptsächlich beteiligten Organe, wie Milz, Leber, Nebennierenrinde, Corpora lutea der Eierstöcke wären dementsprechend lediglich Stapelungsorte für den aus der Nahrung herstammenden Überschuß an Cholesterin.

Andere Autoren [*Chauffard*[1]), *Abelous*[2]), *Soula*[2])] behaupten dementgegen, daß in den obengenannten Organen Cholesterin synthetisch bzw. durch Umarbeitung gewisser Stoffwechselprodukte, hergestellt werde. Im Jahre 1913 hat *Anitschkow*[3]) bei Kaninchen, nach Fütterung mit Cholesterin und Neutralfett, eine Aufstapelung dieser Substanzen im reticuloendothelialen System (R. E. S.) der Milz und Leber festgestellt. Dabei muß betont werden, daß es bei Herbivoren leichter zu Cholesterinablagerungen kommt, infolge gewisser Beeinträchtigung der Cholesterinausscheidung durch Gallensekretion.

Es erschien uns wohl denkbar, daß die Zellen des R. E. S. das Cholesterin nicht allein speichern, sondern auch einen tätigen Anteil an der Umarbeitung dieses Stoffes nehmen. Von dieser Arbeitshypothese ausgehend, versuchten wir, den wahren Sachverhalt experimentell festzustellen. Zuerst haben wir Versuche an Hunden mit Ausschaltung des R. E. S. angestellt. Zu diesem Zwecke wurde bei normalen Hunden das R. E. S. mittels einer kolloidalen Silbersuspension blockiert. Wir

---

[1]) Ann. de med. **8**, Nr. 2, 1920.
[2]) C. r. hebd. d. séanc. de l'acad. d. science **170**, Nr. 10, 1920.
[3]) Zieglers Beitr. **57**, 209, 1914; **59**, 306, 1914.

injizierten den Tieren intravenös eine 2% Corgollösung, je 1 ccm pro Kilogramm Körpergewicht, 18 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme. Vor der Blockierung wurde das Gesamtcholesterin des Serums nach *Autenrieth-Funk*[1]) festgestellt; nach der Blockierung wurden Serienbestimmungen des Gesamtcholesterins mittels derselben Methode ausgeführt in Zeitabschnitten von ½ Stunde, 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 24 Stunden. Betreffs der Methodik muß hervorgehoben werden, daß zur Extraktion der Sterine Chloroform angewendet wurde; die Chloroformextrakte sind öfters gelblich gefärbt, was bei der nachfolgenden kolorimetrischen Bestimmung störend wirkt. Um diesem Nachteil zu entgehen, mischten wir die Chloroformextrakte vorsichtig mit Wasser, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, daß keine Emulsion entstehe. Meistenteils entfärbte sich der gelbliche Extrakt vollständig nach dreimaligem Auswaschen mit Wasser. Der wasserhaltige Extrakt wurde mittels Chlorcalcium bzw. wasserfreien Natriumsulfats entwässert. Der auf diese Weise gereinigte Extrakt konnte dann zur kolorimetrischen Bestimmung angewendet werden, denn nach weiterer Behandlung entsprach seine Farbe vollständig der Standardlösung. Die Genauigkeit dieser Methode wurde mehrmals nachgeprüft, wobei wir festgestellt haben, daß der Fehler zwischen einzelnen parallelen Bestimmungen niemals 1 bis 1½% überstieg. Der Vergleich der Methode von *Autenrieth-Funk* mit der gravimetrischen Methode von *Windaus*[2]) ergab folgende Mengen Cholesterin in 100 ccm Blut: Methode *Autenrieth-Funk* 0,216, 0,200, 0,268 und 0,190 g; Methode *Windaus* 0,196, 0,189, 0,250 und 0,180 g.

Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, daß man mittels der kolorimetrischen Methode etwas größere Mengen erhält als mittels der *Windaus*schen Methode. Dieser anscheinende Unterschied läßt sich leicht erklären: Neben dem durch Digitonin fällbaren Cholesterin befindet sich im Blute noch eine gewisse Menge Oxycholesterin, das durch Digitonin nicht ausgefällt wird, mittels der kolorimetrischen Methode wird hingegen auch dieser Stoff mitbestimmt.

Sollte das R. E. S. nur als Stapelungsort anzusehen sein, so müßte nach einer Blockade desselben das Cholesterin ins Blut übertreten und somit Hypercholesterinämie entstehen. Falls aber das R. E. S. an der Cholesterinumarbeitung mitbeteiligt ist, so wäre nach stattgefundener Blockierung eine Hemmung dieser Tätigkeit zu erwarten und folglich ein Sinken des Cholesterinspiegels im Blute.

Ein Blick auf die betreffende Tabelle I genügt zur Beantwortung dieser Fragen. Nämlich bei acht unter neun untersuchten Hunden

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1913, Nr. 23.

[2]) *Hoppe-Seyler*, Zeitschr. f. phys. Chem. **65**, 110, 1910.

stellte sich nach der Blockierung eine Hypocholesterinämie ein; nur beim Hund 3 blieb der Cholesterinspiegel unverändert. Die Senkung des Cholesterinspiegels nach der Blockierung betrug nach ½ Stunde 12,4 bis 29%; durchschnittlich 20,6%, nach 1 Stunde 26,3 bis 56,2%; durchschnittlich 34,8%, nach 2 Stunden 6,5 bis 56,6%, durchschnittlich 37,6%; nach 3 Stunden um 8,4 bis 54,1%, durchschnittlich 38,6%; nach 4 bis 6 Stunden begann ein allmählicher Anstieg des Cholesterinspiegels sich bemerkbar zu machen; nach 24 Stunden Wiederkehr zur Norm[1]).

Unsere Ergebnisse gewinnen an Interesse, wenn man den Cholesterinspiegel mit dem Blutzuckerspiegel blockierter Hunde vergleicht. Im Gegensatz zu der von uns festgestellten Hypocholesterinämie verursacht dieselbe Blockade, laut Serienuntersuchungen von *Demant*[2]), die in unserem Institut ausgeführt wurden, starke Hyperglykämie. Wie bekannt, tritt der Cholesterin-Zuckerantagonismus schon unter normalen Bedingungen auf. Die starke Hypocholesterinämie nach funktioneller Ausschaltung des R. E. S. beim Hunde mittels kolloidaler Silbersuspension läßt also eher einen tätigen Anteil des R. E. S. an der Cholesterinumarbeitung vermuten.

II.

Des weiteren schien es wichtig festzustellen, in welchem Grade die experimentelle Entfernung eines bedeutenden Teiles des R. E. S. auf den Cholesterinstoffwechsel einwirkt. Zu diesem Zwecke führten wir bei einigen Hunden die Splenektomie aus. 10 Tage nach der Operation blockierten wir in der oben angegebenen Weise das R. E. S. Sowohl vor der Splenektomie wie 10 Tage nach derselben wurde der Cholesterinspiegel des Blutserums in denselben Zeitabständen wie früher bestimmt (Tabelle II).

Die quantitative Cholesterinbestimmung vor und 10 Tage nach der Splenektomie ergab, daß die Milzentfernung bei Hunden eine Cholesterinverminderung von 8,3 bis 14,2% verursacht. Folglich entspricht die Splenektomie einer teilweisen Blockierung des R. E. S., was die von uns vermutete Rolle desselben im Cholesterinstoffwechsel bestätigt. Wir stellten außerdem fest, daß bei splenektomierten Hunden eine nachträgliche Blockade des R. E. S. eine weitere Verminderung des Blutcholesterinspiegels zur Folge hatte, und zwar nach einer

[1]) Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit dem histologischen Bild unseres Materials: in den *Browicz-Kupffer*schen Sternzellen der Leber fand *Laskowski* nach der Blockade reichlich Silberpigment und gänzliches Verschwinden desselben nach 24 Stunden.

[2]) Medycyna Dóswiadoz i Spot, 6, H. 5/6, S. 346 bis 352, 1926.



Tabelle I. **Blockade normaler Hunde.**

Nr.	Gewicht des Hundes kg	Datum 1926	Gesamtcholesterin in 100 ccm Serum vor d. Blockade g	Gesamtcholesterin in 100 ccm Serum $^1/_2$ Std. nach der Blockade g	Senkungs-%	Nach 1 Std. g	Senkungs-%	Nach 2 Std. g	Senkungs-%	Nach 3 Std. g	Senkungs-%	Nach 4 Std. g	Senkungs-%	Nach 5 Std. g	Senkungs-%	Nach 6 Std. g	Senkungs-%	Nach 26 Std. g	Senkungs-%
1	6,2 ♂	17. V.	0,265	—	—	0,166	37,3	0,150	56,6	0,124	53,2								
2	4,3 ♂	19. V.	0,170	—	—	0,170	0,0	0,159	6,5	0,156	8,4								
3	1,9 ♂	20. V.	0,270	0,270	0,0	0,270	0,0	0,270	0,0										
4	5,8 ♂	22. V.	0,167	0,130	19,7	0,116	28,0												
5	8,2 ♂	27. V.	0,182	0,138	24,1	0,116	36,0												
6	10,0 ♂	11. VI.	0,242	0,212	12,4	0,106	56,2	0,136	43,8										
7	7,4 ♂	3. XI.	0,240	0,170	29,2	0,154	35,8	0,145	39,5	0,130	54,1	0,125	48,0	0,130	45,6				
8	5,0 ♂	9. XI.	0,220	0,172	21,7	0,162	26,3	0,124	43,6	—	—	0,124	43,6	0,134	37,0	0,166	24,5	0,225	+ 2,2
9	8,2 ♂	17. XI.	0,180	0,150	16,6	0,135	25,0	0,115	36,1	0,135	38,8	0,135	25,0	0,142	21,1	0,150	16,6	0,180	0

Tabelle II. **Blockade splenektomierter Hunde.**

Nr.	Gewicht des Hundes kg	Datum 1926	Gesamtcholesterin in 100 ccm Serum vor d. Operation g	Gesamtcholesterin in 100 ccm Serum nach der Splenektomie g	Senkungs-%	$^1/_2$ Std. nach der Blockade g	Senkungs-%	Nach 1 Std. g	Senkungs-%	Nach 2 Std. g	Senkungs-%	Nach 3 Std. g	Senkungs-%	Nach 4 Std. g	Senkungs-%	Nach 5 Std. g	Senkungs-%	Nach 6 Std. g	Senkungs-%	Nach 26 Std. g	Senkungs-%
10	13,3 ♂	4. VI.	—	0,158	—	0,130	17,7	0,120	24,0												
11	11,2 ♂	5. VI.	—	0,200	—	0,170	15,0	0,144	28,0	—	—	0,133	33,5								
12	9,0 ♂	10. VI.	—	0,280	—	—	—	0,108	61,4	—	—	0,120	57,1								
13	9,3 ♂	16. VI.	—	0,216	—	—	—	0,158	26,8	—	—	0,157	27,3								
14	10,0 ♂	5. X.	—	0,298	—	0,284	4,7	0,216	27,5	—	—	0,175	41,2								
15	6,7 ♂	8. X.	—	0,220	—	0,202	8,1	0,198	10,8	0,208	5,8	0,207	5,7								
16	8,4 ♂	18. X.	0,243	0,216	11,1	—	—	0,136	25,9	0,136	25,9	0,136	25,9								
17	8,7 ♂	19. X.	0,293	0,268	8,4	0,254	5,2	0,158	33,4	0,146	36,4	0,171	27,6								
18	8,5 ♂	13. XI.	0,195	0,170	12,8	0,145	12,8														
19	6,8 ♂	15. XI.	0,145	0,133	8,3	0,122	7,2	0,107	17,9	0,100	22,7	0,125	5,4								
20	9,3 ♂	10. XII.	0,142	0,128	9,8	0,110	14,0	0,090	29,6	0,095	25,7	0,120	6,2	0,110	14,0	—	—	0,120	6,2	0,127	— 0,7
21	8,3 ♂	11. XII.	0,140	0,120	14,2	0,095	20,4	0,080	33,3	0,080	33,3	0,100	16,6	0,100	16,6	0,110	8,3	—	—	0,123	+ 2,5

halben Stunde um 5,8 bis 20,8 %, durchschnittlich 11,7 %; nach 1 Stunde um 10,8 bis 61,4 % (28,9 %); nach 2 Stunden 5,8 bis 36,4 % (24,9 %), nach 3 Stunden 5,7 bis 57,1 % (24,6 %). Nach 4 bis 5 Stunden beginnt der Cholesterinspiegel anzusteigen; nach 24 Stunden ist er wiederum derselbe wie vor der Blockade.

Wir sehen folglich, daß der bei splenektomierten Tieren bereits vor der Blockade herabgesetzte Cholesterinspiegel nach der Blockade noch tiefer sinkt; jedoch ist die unmittelbare Senkung nach der Blockade weniger ausgesprochen als bei normalen Hunden.

Vergleichen wir nun die nach der Blockade normaler und splenektomierter Hunde erhaltenen Durchschnittswerte, sowie diejenigen nach Splenektomie allein.

Splenektomie	Senkungs-%	Blockade	Senkungs-% nach 1/2 Std.	nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach 3 Std.
—	—	Normale Hunde	20,6	34,8	37,6	38,6
—	8,3—14,2	Splenektomierte Hunde	11,7	28,9	24,9	24,6

Es zeigt sich, daß die gesamte Cholesterinverminderung nach Splenektomie und Blockade im allgemeinen der Cholesterinverminderung blockierter, normaler Hunde entspricht; mit anderen Worten, der Gesamteffekt nach der Blockade ist in beiden Gruppen ungefähr der gleiche.

Derartige systematische Untersuchungen über die Rolle des R. E. S. im Cholesterinstoffwechsel fanden wir in der uns zugänglichen Literatur nicht. Allein *Sokoloff* erwähnt, daß die Blockade von zwei Hunden mittels Collargol eine unbedeutende Hypercholesterinämie zur Folge hatte. *Sokoloffs*[1]) Versuchsbedingungen waren jedoch ganz andere; er blockierte seine Hunde während 10 Tagen mittels täglicher Collargolinjektionen, und erst am 11. Tage wurde der Blutcholesterinspiegel bestimmt. Eine derartig intensive Blockade mußte gewiß eine Schädigung des Lebergewebes hervorrufen. Es ist bekannt, daß nach experimenteller Vergiftung von Hunden mittels Arsen- und Quecksilberverbindungen regelmäßig eine Hypercholesterinämie auftritt. Was den Einfluß der Splenektomie auf die Höhe des Cholesterinspiegels betrifft, so hat *Soper*[2]) behauptet, daß längere Zeit nach der Operation (29 Tage) bei Kaninchen eine unbedeutende Hypercholesterinämie nachzuweisen sei. Andere Autoren [*Abelous* und *Soula*[3])] sind der Meinung, daß die Milz imstande sei, Cholesterin herzustellen. Unsere

---

[1]) Virchows Arch. **245**, 213 bis 218, 1923.
[2]) Zieglers Beitr. **60**, 232 bis 244, 1915.
[3]) l. c.



Beobachtungen bestätigen die Versuchsergebnisse letztgenannter Forscher; nach Entfernung der cholesterinbildenden Milz trat eine Hypocholesterinämie auf. Das scheinbar entgegengesetzte Ergebnis der *Soper*schen Versuche läßt sich dadurch erklären, daß er eine Hypercholesterinämie erst nach 29 Tagen gefunden hat, wo doch während dieser Zeitspanne eine sogenannte Splenektonisation der Leber eintreten konnte: die Proliferation der *Browicz-Kupffer*schen Sternzellen, das Auftreten von lymphatischem Gewebe zwischen den Leberläppchen usw. [*Silvestrini*[1])].

Fassen wir nun unsere Ergebnisse zusammen:

1. Blockade des R. E. S. ruft bei Hunden eine Hypocholesterinämie hervor.

2. Die experimentelle Entfernung eines bedeutenden Teiles des R. E. S. durch Splenektomie hat ebenfalls eine Hypocholesterinämie zur Folge.

3. Die Blockade splenektomierter Hunde verursacht unmittelbar eine minder ausgesprochene Senkung des Cholesterinspiegels als bei normalen Hunden.

4. Die gesamte Verminderung des Cholesterinspiegels im Blutserum splenektomierter und nachträglich blockierter Hunde entspricht quantitativ annähernd einer Verminderung des Cholesterinspiegels nach einer Blockade normaler Hunde.

5. Obige Ergebnisse berechtigen uns zu der Behauptung, daß das R. E. S. nicht lediglich als passives Cholesterindepot zu betrachten ist, sondern daß es an dem Cholesterinstoffwechsel aktiv mitbeteiligt ist.

---

[1]) Arch. ital. d. chir. 2, H. 2/3, S. 165 bis 191, 1920.

Beitrag zur Methodik der Blutzuckerbestimmung nach Hagedorn-Jensen.

Von

L. Csik und A. Juhász.

(Aus dem physiologischen und allgemeinen pathologischen Institut der Universität in Debrecen.)

(Eingegangen am 16. April 1927.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In jüngster Zeit sind verschiedene Mitteilungen erschienen, die sich mit der Frage beschäftigen, ob man die vorzügliche Blutzuckerbestimmungsmethode von *Hagedorn-Jensen* (1), welche diese Autoren für mittels Pipette entnommenes Blut ausgearbeitet hatten, so modifizieren kann, daß die großen Vorteile einer raschen gravimetrischen Bestimmung mittels der Torsionswage möglich werden.

Es ist ferner ein Bedürfnis, die Hagedorn-Jensenmethode so zu modifizieren, daß sie auch für kleine Tiere benutzbar wird. Bei Ratten kann man mittels Pipette nicht genug Blut bekommen, während die *Bang*sche Fließpapiermethode genug Blut liefert. *Dresel* und *Rothmann* (2) empfahlen, das Blut mit Fließpapier zu entnehmen und auf der Torsionswage zu wiegen. Dagegen haben *Diaz* und *Cuencas* (3) mit dieser Methode keine genauen Resultate bekommen. Für die Benutzbarkeit der Fließpapiermethode haben sich dann aber noch *Dingemanse* (4), sowie *Fritz* und *Paul* (7) ausgesprochen, und dieselbe Frage wird auch von *Kaufmann* (5) und *Salomon* (6) diskutiert.

Wir fühlen uns deshalb veranlaßt, mitzuteilen, daß wir die Methode *Hagedorn-Jensen* auch mit der Torsionswage benutzen, aber das Blut nicht mit Fließpapier aufsaugen und damit die eventuellen Fehler dieser Methodik, wie sie sich uns gelegentlich auch gezeigt haben, umgehen. Wir entnahmen einen Tropfen Blut aus dem Ohrläppchen oder der Schwanzspitze einer Ratte in ein kleines Glasgefäß, das wir uns selbst aus Glasröhrchen in mehreren Exemplaren herstellten, so wie es die Abb. 1 zeigt. Das Gewicht des Gefäßes, das etwa 0,200 g beträgt, wird auf der Torsionswage bestimmt. Dann wird es mit der Pinzette angefaßt und ein Tropfen Blut in das Gefäß eingelassen und sofort

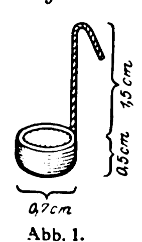


Abb. 1.

wieder gewogen. Die gewogene Blutmenge betrug 0,030 bis 0,120 g. Die Prozedur ist eher schneller als mit Fließpapier und in einigen Sekunden beendigt. Dann wird das Gefäßchen in ein Becherglas mit 6 ccm der Enteiweißungsflüssigkeit (*Hagedorn-Jensen*) geworfen, ein wenig umgeschüttelt und sogleich aufgekocht.

Die Enteiweißung ist vollständig. Es bleibt nichts auf dem Glasgefäßchen kleben. Unsere Analysen zeigen vollständige Übereinstimmung mit den Analysen von mittels Pipette entnommenen Blutproben. Selbstverständlich muß man die gravimetrisch bestimmten Blutmengen, wenn man sie mit volumetrischen Mengen vergleicht (5), mit dem spezifischen Gewicht des Blutes (1055 als Mittel) dividieren, um sie auf gleiche Volumina zu beziehen!

Tabelle I.

Blutzuckerbestimmungen an Kaninchen.

Blutmenge bestimmt mit Gefäß und Torsionswage Blutzucker pro 100 ccm Blut g		Blutmenge bestimmt mit Pipette Blutzucker pro 100 ccm Blut g	
0,118 0,116 0,120 0,117 0,118 0,116	Mittel — 0,117	0,115 0,117	Mittel — 0,116
0,123 0,125	Mittel — 0,124	0,118 0,133	Mittel — 0,126
0,099 0,104 0,118	Mittel — 0,107	0,104 0,104 0,112	Mittel — 0,107
0,120 0,120	Mittel — 0,120	0,124 0,126	Mittel — 0,125

In der Tabelle I sind Parallelbestimmungen an Kaninchenblut angeführt. Die Bestimmungen wurden parallel an mittels Pipette und nach unserer Modifikation gravimetrisch bestimmten Blutproben gemacht. Die gravimetrisch gewonnenen Werte sind auf Volumen umgerechnet. Die Mittelwerte der beiden Kolumnen stimmen vollständig überein.

Tabelle II zeigt die Verwertbarkeit der Methodik für Rattenblut, das aus der Schwanzspitze von kleinen Exemplaren entnommen wurde.

Diese Modifikation macht es also möglich, daß man die großen Vorteile der raschen Wägung mit der Torsionswage an Stelle des Pipettierens zum Abmessen benutzt, ohne die möglichen Fehlerquellen des Fließpapiers. Die Methode von *Hagedorn-Jensen* ist dadurch auch

Tabelle II.

Blutzuckerbestimmungen an Ratten.

Tier Nr.	Blutmenge g	Blutzucker pro 100 g Blut g
1	0,0520	0,117
	0,0699	0,118
	0,0503	0,121
2	0,0690	0,109
	0,0747	0,111
	0,0528	0,122
3	0,0404	0,150
	0,0416	0,146
	0,0427	0,151
4	0,0446	0,121
	0,0936	0,125
	0,0702	0,121

zur Blutzuckerbestimmung bei kleinen Tieren verwendbar, wo die Blutentnahme mittels Pipette im Stich läßt[1]). (Ausgeführt unter Aufsicht von Herrn Prof. *F. Verzár.*)

Literatur.

1) *C. Hagedorn* und *B. N. Jensen*, diese Zeitschr. **135**, 46, **1923**; **137**, 92, **1923**. — 2) *K. Dresel* und *H. Rothmann*, ebendaselbst **146**, 538, **1924**; **157**, 172, **1925**. — 3) *C. J. Diaz* und *S. Cuenca*, ebendaselbst **153**, 97, **1924**. — 4) *E. Dingemanse*, ebendaselbst **154**, 483, **1924**. — 5) *E. Kaufmann*, ebendaselbst **166**, 207, **1926**. — 6) *K. Salomon*, ebendaselbst **178**, 228, **1926**. — 7) Zitiert nach *Kaufmann*, l. c.

---

[1]) Auf diese Weise kann auch die Blutmenge für andere Mikroverfahren leicht bestimmt werden. So haben wir sie für Katalasebestimmungen im Blute von Ratten verwendet.

Über die Einwirkung von $[H^{\cdot}]$ und $[OH']$ auf die Wasserbewegung durch Kollodiummembranen.

Von

P. J. Jurišić.

(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie und Pharmakologie der Universität in Zagreb.)

(Eingegangen am 20. April 1927.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Nachdem ich[1]) in einer früheren Arbeit zeigen konnte, daß die *Loeb*schen Untersuchungen über die anomale Flüssigkeitsüberführung durch Kollodiummembranen, was den Kurvenverlauf und die Breite des anomalen Konzentrationsbereichs anbelangt, keine allgemeine Gültigkeit haben, wurden Untersuchungen vorgenommen, um die Einwirkung von H- bzw. OH-Ionen auf die erwähnten Vorgänge genauer zu verfolgen. Wie aus weiter unten angeführten Gründen hervorgeht, liegt der Zweck der vorliegenden Mitteilung darin, einen Beitrag zur Theorie der anomalen Osmose zu liefern.

Bei der Erklärung der anomalen osmotischen Erscheinungen wurden in erster Linie das thermodynamische (ε) und das elektrokinetische (ζ) Potential in Betracht gezogen. Durch das Zusammenwirken beider Potentiale wird die elektroosmotische Flüssigkeitsüberführung bewerkstelligt. Man kann sich diese Verhältnisse durch ein von *Höber*[2]) entworfenes Schema anschaulich machen.

Durch die Pore und Membranwand fließt der elektrische Strom, welcher die elektroosmotische Flüssigkeitsüberführung durch die Pore bewirkt. Das ζ-Potential ist durch die elektrische Doppelschicht der Membranpore, das ε-Potential dagegen durch die elektrischen Belegungen der Membranwand, der Außenflüssigkeit bzw. der Innenlösung zu, bedingt. *Freundlich*[3]) hat hervorgehoben, daß die Arbeitsleistung bei der Flüssigkeitsüberführung

---

[1]) *P. J. Jurišić*, Physik. Zeitschr. **27**, 1926.

[2]) *R. Höber*, Phys. Chem. d. Zelle u. Gewebe 1926, S. 159.

[3]) *H. Freundlich*, Kolloid-Zeitschr. **18**, 1916.



durch die Pore nur von ε-Potentialen bewerkstelligt werden kann. Als Folge des ε-Potentials fungieren die beiden Grenzflächen der Membran „wie zwei Elektroden, die untereinander wie durch einen Draht durch die stromleitende Membransubstanz verbunden sind, und die in zwei verschiedene Elektrolyte eintauchen, welche im Porenlumen einander berühren" (*Höber*, l. c., S. 158). Membranpotentiale kann man durch Ableitung mit Kalomelelektroden aus der Innenlösung und Außenflüssigkeit messend verfolgen. Diese Potentiale entsprechen der bei der Elektroosmose angelegten elektromotorischen Kraft. *Loeb*[1]) hat wieder die anomale Flüssigkeitsüberführung als eine Funktion von $\varepsilon \cdot \zeta$ aufgefaßt.

In der vorliegenden Mitteilung wird der Beweis erbracht, daß zwischen der Einwirkung von $[H^{\cdot}]$ *und* $[OH']$ *auf die Flüssigkeitsbewegung durch Kollodiummembranen und den abgeleiteten Potentialdifferenzen aus der Innenlösung und Außenflüssigkeit keine Beziehungen bestehen.* Bezüglich der Untersuchungsmethodik verweise ich auf meine oben zitierte Arbeit. Bemerken möchte ich bloß, daß bei den in dieser Mitteilung dargelegten Versuchen Osmometer mit vertikalem kapillaren Steigrohr verwendet wurden. Abb. 1 zeigt die Einwirkung von $[H^{\cdot}]$. Als Innenlösung in der Kollodiumhülse wurde in allen Versuchen eine bestimmte Konzentration (m/4) von Na_2SO_4, gelöst in HCl-Lösungen von verschiedenen Normalitäten, verwendet. Die dargestellte Kurve ist eine Zeitkurve, indem die Zeit gemessen wurde, welche die Flüssigkeitssäule brauchte, um im Steigrohr 40 ccm zu durchlaufen. Als Außenflüssigkeit war destilliertes Wasser.

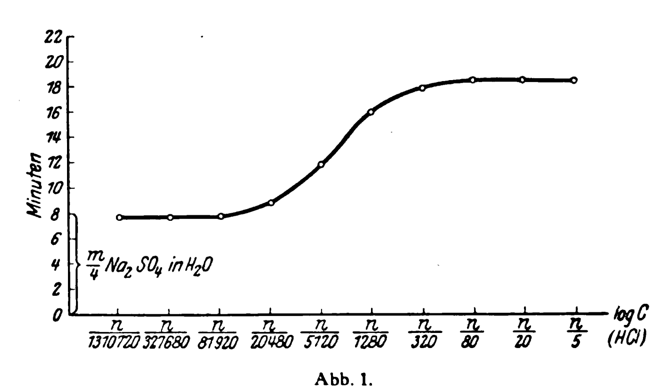


Abb. 1.
Einwirkung von H-Ionen auf die Flüssigkeitsüberführung durch Kollodiummembranen.

Man sieht, daß die Flüssigkeitssäule im Steigrohr bei einer *wässerigen* m/4 Na_2SO_4-Lösung in der Kollodiumhülse 8 Minuten brauchte, um 40 cm im Steigrohr zu durchlaufen. Die Einwirkung von $[H^{\cdot}]$ kommt von Konzentrationen von n/20480 bis n/80 HCl als Hemmungsfaktor

[1]) *J. Loeb*, Journ. of gen. physiol. **4**, **5**.

deutlich zum Ausdruck[1]). *Von n/80 bis n/5 HCl konnte in keinem Versuch eine Steigerung der Hemmungswirkung konstatiert werden.* Abb. 2 stellt ebenfalls eine Zeitkurve der Flüssigkeitsüberführung, bei sonst gleichen Versuchsbedingungen wie in Abb. 1, unter Einwirkung von verschiedenen KOH-Konzentrationen, dar.

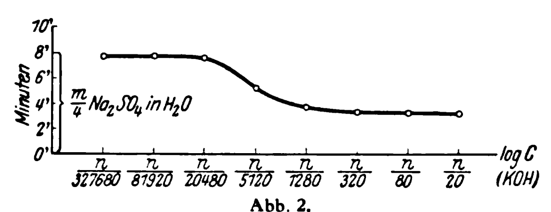


Abb. 2.
Einwirkung von OH-Ionen auf die Flüssigkeitsüberführung durch Kollodiummembranen.

Von n/20480 bis n/80 KOH finden wir mit wachsender [OH′] eine Beschleunigung der Flüssigkeitsüberführung im Steigrohr. *Von n/80 bis n/5 KOH konnte ebenfalls kein Unterschied in der Beschleunigung konstatiert werden.*

Die Messungen der von Innenlösung und Außenflüssigkeit abgeleiteten Potentialdifferenzen wurden mit Kompensationsverfahren ausgeführt. Als Ableitungselektroden dienten gesättigte Kalomelelektroden. Gemessen wurde 10 Minuten nach dem Eintauchen der Kollodiumhülse in die Außenflüssigkeit. Abb. 3 stellt die Ergebnisse dieser Messungen graphisch dar.

Man sieht, daß die *Richtung* der abgeleiteten Potentialdifferenzen in HCl-Lösungen und in wässeriger Salzlösung dieselbe bleibt. Die

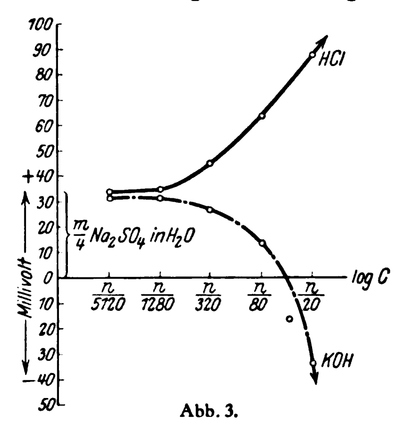


Abb. 3.
Graphische Darstellung von Potentialdifferenzen zwischen der Innenlösung und Außenflüssigkeit zu Abb. 1 und 2.

[1]) Selbstverständlich ist schon n/20480 HCl bzw. KOH in bezug auf p_H undefiniert. Bei uns handelte es sich bloß darum, nur einen Schwellenwert zu erhalten.



Innenlösung ist der negative Pol. In dem Salz-Säuregemisch addieren sich die negativierenden Wirkungen der einzelnen Komponenten. Mit wachsender [H˙] *wachsen* die abgeleiteten Potentialdifferenzen, während die Geschwindigkeit der Flüssigkeitsüberführung im Steigrohr bis n/80 *abnimmt*. Im Salz-Laugegemisch subtrahiert sich die positivierende Wirkung der Lauge von der negativierenden Wirkung des Salzes. Mit wachsender [OH′] *sinken* die abgeleiteten Potentialdifferenzen, um bei einer bestimmten Laugekonzentration das *entgegengesetzte* Vorzeichen anzunehmen, während die Geschwindigkeit der Flüssigkeitsüberführung bis n/80 *wächst*. *Man sieht also, daß zwischen der Einwirkung von H- und OH-Ionen und der abgeleiteten Potentialdifferenzen kein Parallelismus besteht.*

Für das Entgegenkommen bei dieser Arbeit spreche ich Herrn Prof. *M. Miculicich* meinen Dank aus.

Von Bedingungen, unter welchen die Jod-Stärke-Reaktion in ihrer klassischen Form nicht stattfindet.

Von

M. J. Gramenitzki.

(Aus dem pharmakologischen Laboratorium des Staatlichen Instituts für medizinische Wissenschaften zu Leningrad.)

(Eingegangen am 20. April 1927.)

Die zu berichtende Erscheinung besteht darin, daß die wohlbekannte klassische Reaktion — die Bläuung der Stärke bei Gegenwart von Jod und das Verschwinden dieser Bläuung beim Erwärmen — bei einigen Versuchsbedingungen nur in ihrem ersten Teil gelingt, nicht aber im zweiten, d. h., daß die Stärkelösung, die bei Zimmertemperatur gebläut, beim Erwärmen nicht nur ihre Färbung verliert, sondern diese Farbe noch intensiver wird.

Nicht ohne Schwierigkeiten habe ich die Bedingungen für das Zustandekommen dieses Phänomens genauer bestimmt.

Es sind drei Stoffe, welche in die Reaktion eingeführt sein müssen, um diese Erscheinung zustande zu bringen. Das sind: 1. KJ, 2. H_2O_2 und 3. Säure (z. B. HCl.). Ich habe mich überzeugt, daß die Einführung in die Reaktion nur eines dieser Stoffe oder sogar zweier in beliebigen Kombinationen ohne allen Erfolg bleibt.

Als Beispiele führe ich einige von meinen Versuchen an.

Versuch 1.

a) ¼% Stärkelösung 3 ccm; Jodtinktur 1 : 100 1 Tropfen; 3% H_2O_2 3 Tropfen. Das Resultat: die Mischung, gebläut bei Zimmertemperatur, entfärbt sich beim Erwärmen; bei Abkühlung färbt sie sich wieder.

b) ¼% Stärkelösung 3 ccm; Jodtinktur 1 Tropfen; HCl (Acid. hydrochlor. dilutum) 2 Tropfen; Das Resultat: wie bei a).

c) Stärkelösung 3 ccm; Jodtinktur 1 Tropfen; 5% KJ 5 Tropfen. Das Resultat: wie bei a).

d) Stärkelösung 3 ccm; Jodtinktur 1 Tropfen; 3% H_2O_2 3 Tropfen; HCl 2 Tropfen. Das Resultat: wie bei a).

e) Stärkelösung 3 ccm; Jodtinktur 1 Tropfen; HCl 2 Tropfen; 5% KJ 5 Tropfen. Das Resultat: wie bei a).



f) Stärkelösung 3 ccm; Jodtinktur 1 Tropfen; H_2O_2 3 Tropfen; 5% KJ 5 Tropfen. Das Resultat: Die Blaufärbung verschwindet beim Erwärmen, aber die Lösung sieht etwas gelblich aus.

g) Stärkelösung 3 ccm; Jodtinktur 1 Tropfen; H_2O_2 3 Tropfen; 5% KJ 5 Tropfen; HCl 2 Tropfen. Das Resultat: *beim Erwärmen wird die blaue Färbung noch intensiver und dunkler und bleibt auch bei Siedetemperatur bestehen.*

Versuch 2.

a) ¼% Stärkelösung 2 ccm; Wasser 3 ccm; 5% KJ 7 Tropfen; HCl 2 Tropfen. Das Resultat: Schon bei Zimmertemperatur tritt allmählich die blaue Färbung ein; während des Erwärmens verstärkt sie sich zeitweilig, aber bei weiterem Erwärmen — bis zum Sieden — verschwindet sie. *Es genügt, bei diesen Bedingungen etwas, z. B. 2 bis 3 bis 4 Tropfen, von 3% H_2O_2 hinzuzufügen, um die blaue Färbung von neuem hervorzurufen, die auch bei Siedetemperatur beständig bleibt.*

b) ¼% Stärkelösung 2 ccm; Wasser 3 ccm; 5% KJ 7 Tropfen; 3% H_2O_2 3 Tropfen. Das Resultat: Ziemlich schnell tritt bei Zimmertemperatur die blaue Färbung ein, welche während des Erwärmens sich verstärkt, aber bei weiterem Erwärmen bis zur Siedetemperatur verschwindet und in eine gelbliche Färbung übertritt. *Es genügt, bei diesen Bedingungen etwas, z. B. 2 Tropfen, HCl-Säure hinzuzufügen, um die blaue Färbung von neuem hervorzurufen.*

c) ¼% Stärkelösung 2 ccm; Wasser 3 ccm; HCl 2 Tropfen; 3% H_2O_2 3 Tropfen. Das Resultat: Bei Siedetemperatur wie bei Zimmertemperatur natürlich keine Färbung; *bei Siedetemperatur hat man 2 Tropfen Jodtinktur hinzugefügt: keine Blaufärbung. Dazu 7 Tropfen 5% KJ: starke, dunkelblaue Färbung.*

d) Wasser 3 ccm; 5% KJ 7 Tropfen; H_2O_2 3 Tropfen; HCl 3 Tropfen. Beim Erwärmen bis zur Siedetemperatur tritt etwas gelbliche Färbung der Flüssigkeit ein. *Dazu etwas von ¼% Stärkelösung, 15 Tropfen: starke dunkelblaue Färbung.*

Aus den beschriebenen Versuchen kann man den Schluß ziehen, daß für das Zustandekommen des Phänomens alle drei Stoffe: KJ, H_2O_2 und Säure notwendig sind (die Essigsäure hat ähnliche Wirkung). Nimmt man anstatt des KJ Jodtinktur, so bleibt die Erscheinung aus. Nimmt man anstatt 5 bis 7 Tropfen von 5% KJ nur 1 Tropfen oder noch weniger, so bleibt die blaue Farbe bei Siedetemperatur nicht lange bestehen, und allmählich färbt sich die Flüssigkeit gelblich (die Farbe der Jodlösung).

Es ist keine leichte Aufgabe, die nächste Ursache der Erscheinung aufzufinden. Unsere Voraussetzungen sind folgende.

Man glaubt, daß *für das Zustandekommen der Jod-Stärke-Blaufärbung die Jodwasserstoffsäure notwendig ist,* und daß chemisch reines Jod keine blaue Stärkefärbung gibt[1]). Dieses vorausgesetzt, liegt es nahe, anzunehmen, daß das Verschwinden der blauen Färbung beim Er-

[1]) *Schmidt,* Ausführliche pharmazeutische Chemie 1909; *Ginsburg,* Lehrb. d. organ. Chem. 1917 (russisch).



wärmen von dem Verschwinden dieser Jodwasserstoffsäuremoleküle abhängt, d. h. von einer Dissoziation dieser Verbindung. Wenn es so ist, darf man erwarten, daß *alle Bedingungen, welche diese Dissoziation der Jodwasserstoffsäuremoleküle (bei Siedetemperatur) vermindern, auf die Beständigkeit und Erhaltung dieser Färbung günstig wirken müssen.* Es ist klar, daß z. B. HCl-Säure, welche eine stärkere Säure ist, fähig ist, diese Dissoziation der KJ-Moleküle zu vermindern.

Wie gesagt, mit Jod, ohne KJ, bleibt die Reaktion aus. Das kann man so deuten, daß das Stadium der Oxydierung des KJ durch H_2O_2 eine große Rolle spielen muß. Man kann erwarten, daß dabei einige Quantitäten der HJ-Säure sich bilden können (vielleicht in statu nascendi ?). Wenn das aber so ist, ist es klar, daß HCl-Säure die Dissoziation der sich bildenden HJ-Säure vermindert, und die Färbung bleibt auch bei Siedetemperatur beständig.

Über die Abschwächung der oxydierenden Eigenschaften des Eisenchlorids beim Erwärmen und die Regeneration derselben.

Von

M. J. Gramenitzki.

(Aus dem pharmakologischen Laboratorium des Staatlichen Instituts für Medizinische Wissenschaften zu Leningrad.)

(Eingegangen am 20. April 1927.)

Bei der Verfolgung einiger biochemischen, oxydierenden Reaktionen habe ich zufällig das zu berichtende Phänomen beobachtet. Ich halte die Mitteilung desselben für angezeigt, weil die Erscheinung sowohl vom chemischen als auch vom biochemischen Standpunkt aus ein gewisses Interesse haben kann.

Bekanntlich wird die Reaktion von Guajaktinktur und auch von Jodkali (bei Gegenwart von Stärke) mit aktivem Sauerstoff durch Eisenchlorid katalysiert. Ich erwärmte die $FeCl_3$-Lösung bis zum Sieden, kühlte sie wieder ab und beobachtete, daß sowohl die Blaufärbung des Guajaks wie auch das Freiwerden des Jods durch aktiven Sauerstoff offenbar gelähmt wurden.

Bei weiterer Verfolgung dieser Reaktion habe ich solche Versuchsbedingungen zu ermitteln versucht, bei welchen dieser Unterschied zwischen dem erwärmten und unerwärmten Eisenchlorid in bezug auf die oxydierenden Eigenschaften besonders klar und deutlich war.

Folgende Versuche sollen als Beispiel dienen.

Versuch 1.

$FeCl_3$-Lösung (Ferrum sesquichloratum officinale) mit Wasser in Proportion 1 : 200 verdünnt und 1 Minute lang aufgekocht. Stärkelösung 1 : 200. KJ-Lösung 5%.

a) Kontrolle: Wasser 5 ccm; Stärkelösung 10 Tropfen; KJ-Lösung 5 Tropfen; $FeCl_3$-Lösung *unerwärmt* 4 Tropfen. Das Resultat: *Die Bläuung von Stärke tritt fast momentan ein* und nimmt schnell zu.

b) Wasser 5 ccm; Stärkelösung 10 Tropfen; KJ-Lösung 5 Tropfen; *$FeCl_2$-Lösung, eben 1 Minute lang aufgekocht und rasch abgekühlt,* 4 Tropfen. Das Resultat: *Die Reaktion der Bläuung beginnt erst nach 55 Sekunden* und schreitet ganz langsam vor.

c) Ebenso wie bei b), aber *nach 4 Minuten Stehenlassen der $FeCl_3$-Lösung* Das Resultat: *Die Reaktion beginnt nach 40 Sekunden.*

d) Ebenso wie bei b), aber *nach 8 Minuten Stehenlassen der $FeCl_3$-Lösung.* Das Resultat: Die Reaktion beginnt nach 30 Sekunden.

Versuch 2.

$FeCl_3$-Lösung mit Wasser in Proportion 1 : 200 verdünnt.

a) Kontrolle: Wasser 4 ccm; Guajaktinktur (frisch bereitet) 5 Tropfen; $FeCl_3$-Lösung 2 Tropfen. Das Resultat: Die Bläuung tritt momentan ein und schreitet rasch vor.

b) Wasser 4 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; $FeCl_3$-Lösung *eben 1 Minute lang aufgekocht und rasch abgekühlt,* 2 Tropfen. Das Resultat: *Die Reaktion der Bläuung beginnt erst nach 3½ Minuten* und schreitet ganz langsam vor.

e) Wie bei b), aber *nach 15 Minuten Stehenlassen der FeCl-Lösung* (bei Zimmertemperatur). Das Resultat: *Die Reaktion beginnt schon nach 1¼ Minuten.*

Versuch 3.

$FeCl_3$-Lösung mit Wasser in Proportion 1 : 200 verdünnt.

a) Kontrolle: Wasser 5 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; $FeCl_3$-Lösung 2 Tropfen. Das Resultat: Die Reaktion tritt momentan ein und ist sehr intensiv.

b) Wasser 5 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; $FeCl_3$-Lösung, *eben bis zum Sieden erwärmt und rasch abgekühlt,* 2 Tropfen. Das Resultat: *Die Reaktion beginnt nach 25 Sekunden.*

c) Wie bei b), aber *nach 4 Minuten Stehenlassen* der $FeCl_3$-Lösung Das Resultat: *Die Reaktion beginnt nach 15 Sekunden.*

d) Wie bei b), aber *nach 12 Minuten Stehenlassen der $FeCl_3$-Lösung.* Das Resultat: *Die Reaktion beginnt nach 9 Sekunden.*

e) Wie bei b), aber nach 20 Stunden Stehenlassen (bei Zimmertemperatur im Probierglas mit Paraffin zugeschmolzen). Das Resultat: *Die Reaktion beginnt momentan und ist ungefähr ebenso intensiv wie bei a).*

Aus diesen Versuchen kann man zwei Schlüsse ziehen: 1. eine Abschwächung (oder zeitweilige Vernichtung?) der oxydierenden Eigenschaften der $FeCl_3$-Lösung nach Erwärmen und 2. eine Restitution („Regeneration“) dieser Eigenschaften, was mit verschiedener Intensität, je nach den Versuchsbedingungen, vor sich geht.

Nach Feststellung dieses Phänomens kommen wir zu seiner Aufklärung. Unmittelbare Literatur bezüglich dieser Frage ist mir unbekannt.

In dieser Beziehung scheint mir sehr wichtig, was *Ostwald* in seiner „Schule der Chemie“ (II. Teil) sagt: . . . „bei Erwärmen wird die $FeCl_3$-Lösung, bis zu schwacher Farbe verdünnt . . . rotbraun . . . scheidet sich Ferrumhydroxyd im kolloidalen Zustand aus . . . Bei Abkühlung bleibt die rotbraune Färbung bestehen, weil kolloidales

Ferrumhydroxyd sich ganz langsam auflöst; während einiger Tage wird die Farbe der erwärmten Lösung weniger intensiv, bis die Flüssigkeit dieselbe Farbe annimmt, wie vor dem Erwärmen."

Es ist selbstverständlich, daß wir bei unseren Versuchen solche Änderungen der Farbe ebenso beobachtet haben.

Es liegt nahe anzunehmen, daß die Zahl der dissoziierten Ferrichloridmoleküle bei Erwärmen sich vermindert; aber es hängt, wie wir annehmen können, die Oxydierung bei unserer Reaktion von der Dissoziation dieser Moleküle und weiter von dem Übergang des $FeCl_3$ in $FeCl_2$ ($Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ in $Fe^{\cdot\cdot}$), d. h. in letzter Linie vom aktiven Chlor ab.

Es scheint, daß diese mitgeteilte chemische Erscheinung vom Standpunkt der Biochemie aus von Interesse sein kann. Das Verlorengehen der oxydierenden Eigenschaften eines oxydierenden Agens und die spontane Regeneration dieser Eigenschaften erinnert uns an die Erscheinungen, welche wir bei Fermenten beobachtet hatten. Ich[1]) habe früher gezeigt, daß einige Fermente, sowohl oxydierende als auch hydrolytische, nach Erwärmen ihre spezifischen Eigenschaften zwar eingebüßt haben, aber später Schritt für Schritt, bald sehr schnell, bald außerordentlich langsam, diese verlorenen spezifischen Eigenschaften spontan regenerieren.

Ich suchte die Aufklärung dieser Erscheinung in der Änderung des kolloidalen Zustandes des Ferments beim Erwärmen; ja es gelang mir zu zeigen[2]), daß die Oberflächenspannung in der erwärmten Fermentlösung ab- und bei Regeneration des Ferments zunimmt. Aber es ist möglich, daß auch andere, rein chemische Änderungen in Fermentlösungen bei Erwärmen sich vollziehen; diese Änderungen können reversibel sein, und nur zeitweilig werden die Fermente ihrer spezifischen Eigenschaften beraubt.

Das Phänomen der Regeneration des Eisenchlorids kann als ein Modell, als ein Prototyp dieser vorauszusetzenden chemischen Änderungen dienen.

---

[1]) *M. Gramenitzki*, Über den Einfluß verschiedener Temperaturen auf Fermente und die Regeneration der fermentativen Eigenschaften. Dissertation 1910 (russisch). Über den Einfluß der hohen Temperaturen auf das diastatische Ferment. Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**, 286, 1910.

[2]) *Derselbe*, diese Zeitschr. **58**, 142, 1913.

Von der Möglichkeit der Verwandlung einer fermentativen Eigenschaft in die andere in Abhängigkeit von Versuchsbedingungen.

Von

M. J. Gramenitzki.

(Aus dem pharmakologischen Laboratorium des Staatlichen Instituts der Medizinischen Wissenschaften zu Leningrad.)

(Eingegangen am 20. April 1927.)

Es ist wohl bekannt, daß weder das Blut für sich noch H_2O_2 für sich die blaue Färbung der Guajaktinktur hervorzurufen fähig sind. Bei einer Kombination dieser Stoffe tritt aber diese Reaktion immer zutage.

Wenn wir diese Ergebnisse in der Sprache der Fermentologie ausdrücken wollen, können wir sagen, daß *das Blut als Peroxydase wirkt,* d. h. als Ferment (oder ein anderer Katalysator), welches nur bei Gegenwart von H_2O_2 zur Wirkung kommt.

Ich habe die Absicht, ein Phänomen mitzuteilen, welches ich während der Arbeiten auf dem Gebiet der Biochemie konstatieren konnte und welches meines Erachtens sowohl an sich als in biochemischer Beziehung von gewissem Interesse ist.

Die Aufgabe war, zu untersuchen, welchen Einfluß auf die oxydative Reaktion die wechselnden Quantitäten des Blutes haben können. Es hat sich ergeben, daß bis zu einer gewissen Grenze die Intensität der Reaktion mit den zunehmenden Mengen des Blutes parallel geht, was schon a priori zu erwarten war.

Aber wenn wir die Menge des reagierenden Blutes weiter vergrößern, schwächt sich die oxydierende Reaktion und bleibt schließlich ganz aus.

Folgende Versuche sollen das beweisen.

Versuch 1.

Die reagierenden Gemische bestehen aus: Wassertemperatur 38° C; 3% H_2O_2; Guajaktinktur (frisch bereitet); frisches Kaninchenblut in destilliertem Wasser aufgelöst.

a) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; H_2O_2 1 Tropfen; Blut 1 : 1000 1 Tropfen.

b) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; H_2O_2 1 Tropfen; Blut 1 : 1000 3 Tropfen.

c) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; H_2O_2 1 Tropfen; Blut 1 : 1000 6 Tropfen.

Das Resultat: Bei c) tritt die Reaktion fast momentan ein und ist ziemlich stark; bei b) etwas schwächer; bei a) beginnt die Reaktion nur nach 2 Minuten und geht sehr langsam vorwärts.

Versuch 2.

a) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; H_2O_2 1 Tropfen; Blut 1 : 1000 5 Tropfen.

b) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; H_2O_2 1 Tropfen; Blut 1 : 100 1 Tropfen.

c) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; H_2O_2 1 Tropfen; Blut 1 : 100 5 Tropfen.

d) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; H_2O_2 1 Tropfen; Blut 1 : 10 1 Tropfen.

e) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; H_2O_2 1 Tropfen; Blut 1 : 10 5 Tropfen.

Das Resultat: Die Reaktion tritt momentan ein bei c); bei b) etwas schwächer; bei a) noch etwas schwächer; bei d) ist die Reaktion sehr schwach; bei e) keine Reaktion; das Gemisch sieht etwas gelblich aus (die Gegenwart der roten Farbe des Blutes im Gemisch); sehr heftige Gasentwicklung. Wenn man einen Tropfen von $FeCl_3$-Lösung (1 : 10) oder 3 bis 4 Tropfen von 3% H_2O_2 dazugibt, bekommt man sofort blaue Färbung mit etwas grünem Ton.

Wenn man zu b) oder c) nach dem Zustandekommen der blauen Farbe 5 Tropfen des Blutes 1 : 10 zugibt, verschwindet diese Farbe nicht und wird nur etwas grüner und gelblicher.

Aus diesen — und ähnlichen — Versuchen läßt sich der Schluß ziehen, daß es irgend ein Optimum der Blutquantität gibt, unter und besonders über welchem die oxydative Reaktion sich verlangsamt oder überhaupt gar nicht eintritt.

Die Abschwächung der Reaktion bei sinkenden Quantitäten des Blutes konnte man voraussagen. Aber es wäre unmöglich, diese für zunehmende Quantitäten des Blutes vorauszusagen. Im Gegenteil konnte man erwarten, daß mit zunehmenden Quantitäten des Blutes — des Katalysators — die oxydative Reaktion immer deutlicher zutage treten würde.

Daß das Hinzufügen des $FeCl_3$ zu solchem Gemisch, welches keinen oxydativen Effekt gegeben hatte, sofort die Oxydation hervorruft,

läßt darauf schließen, daß die Guajaktinktur keine Änderung erlitten hat und fähig ist, als Reagens auf den aktiven Sauerstoff zu dienen.

Warum bildet sich der aktive Sauerstoff nicht?

Meines Erachtens liegt die Aufklärung dieses Phänomens darin, daß *bei verhältnismäßig großen Quantitäten des Blutes und kleinen des H_2O_2 die katalatischen — anstatt peroxydatischen — Eigenschaften zustande kommen.* Dafür spricht schon die heftige Gasentwicklung.

Also, das Endresultat der Reaktion — oxydierende oder katalysierende — hängt von den quantitativen Verhältnissen der reagierenden Stoffe, des Blutes und des H_2O_2, ab.

Daß es sich hier um quantitative Beziehungen der reagierenden Stoffe handelt, sieht man daraus, daß, wenn man größere Quantitäten des H_2O_2 zu solchen Gemischen zusetzt, wo das Blut als Katalase — nicht als Peroxydase — wirkte, wieder die peroxydatischen Eigenschaften des Blutes zutage treten.

Wenn dem so ist, könnte man erwarten, daß bei Verminderung — bis zu einem gewissen Grade selbstverständlich — der Quantitäten des H_2O_2, solche Quantitäten von Blut, welche sonst als Peroxydase wirkten, als Katalase zutage treten müßten.

Dazu will ich aus meinen Versuchen zwei folgende Beispiele anführen.

Versuch 3.

a) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; 0,3% H_2O_2 2 Tropfen; Blut 1 : 100 1 Tropfen.

b) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; 0,3% H_2O_2 2 Tropfen; Blut 1 : 100 3 Tropfen.

c) Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; 0,3% H_2O_2 2 Tropfen; Blut 1 : 10 1 Tropfen.

Das Resultat: Bei b) die Reaktion sehr rasch und deutlich; etwas schwächer bei a); bei c) *keine Reaktion*; dazu 1 Tropfen 3% H_2O_2: die blaue Färbung tritt ein.

Versuch 4.

Wasser 3 ccm; Guajaktinktur 5 Tropfen; 3% H_2O_2 20 Tropfen; Blut 1 : 10 5 Tropfen. Das Resultat: Sehr starke Reaktion.

Diese Versuche zeigen ebenfalls, daß Mengenverhältnisse der reagierenden Stoffe bei diesen Reaktionen eine ausschlaggebende Rolle spielen.

Wenn wir näher verstehen wollen, warum denn in einem Falle ein oxydativer Vorgang zustande kommt, im anderen aber nicht,

müssen wir die prinzipielle Voraussetzung machen, daß im ersten Falle ein aktiver Sauerstoff sich bildet, im zweiten kein aktiver, sondern nur molekularer Sauerstoff. Es ist bekannt, daß die Zerlegung des H_2O_2 gerade in diesen zwei Richtungen vor sich gehen kann.

Es fragt sich nun, ob wir — wenn auch ungefähr — verstehen können, welche Rolle die größeren oder kleineren Quantitäten des Blutes dabei spielen? Es wäre — scheint es mir — unrichtig, zu glauben, daß bei Vergrößerung der Quantitäten des Blutes in der Reaktion dieses Blut neue Eigenschaften erhält und frühere verliert, nämlich in dem Sinne, daß größere Quantitäten des Blutes das Wasserstoffsuperoxyd mit Freimachung des zweiatomigen (molekularen) und kleinere mit Freimachung monoatomigen Sauerstoffs zerlegen. Solche zu radikale Änderung der Eigenschaften eines Stoffes, welche von bloßer Änderung seiner Quantitäten abhängig wäre, wäre von unseren allgemeinen Gesichtspunkten aus wenig verständlich.

Um solchen Dualismus auszuschließen, scheint es möglich, folgenden Aufklärungsversuch zu geben. Das Blut hat die — uns näher unbekannte — Eigenschaft, das H_2O_2 nur mit Freimachung des aktiven atomaren Sauerstoffs zu zerlegen. Wenn das Blut — d. h. seine Hämoglobinmoleküle — in großen Mengen in einer Lösung sich befindet, also die Moleküle sehr eng aneinander liegen bleiben, dann muß man erwarten, daß die zwei von zwei Molekülen des Hämoglobins sich bildenden Sauerstoffatome ebenso eng liegen. Deshalb *können sie sich, den Kräften der chemischen Affinität folgend, in ein Sauerstoffmolekül verwandeln, bevor die Oxydation der zu oxydierenden Substanz (in unserem Falle Guajakharz) zustande kommt.*

Man kann sich weiter vorstellen, daß bei denselben ziemlich großen Quantitäten des Blutes und bei Überschuß des H_2O_2 nicht alle sich bildenden Sauerstoffatome die Zeit haben, ein Sauerstoffmolekül zu bilden und die zur Oxydation fähige Substanz oxydieren.

Wenn wir alle diese Verhältnisse (die Frage von der nächsten Ursache der Erscheinung nicht berührend) in der Sprache der Fermentologie ausdrücken wollen, können wir sagen, daß bei unseren Versuchsbedingungen *die Katalase sich in die Peroxydase verwandeln kann und umgekehrt,* und diese beiden Eigenschaften ohne Zweifel von einer und derselben Substanz abhängig sind.

Diese Reaktion kann auch vom Standpunkt der Biochemie aus ein gewisses Interesse haben, weil wir allen Versuchsbedingungen, dem Blute, der Temperatur, dem Superoxyd bei Lebensbedingungen begegnen. Wenn es bis jetzt nicht gelingt, das H_2O_2 im Organismus nachzuweisen, so besteht doch kein Zweifel darüber, daß Superoxyde überhaupt in Stoffwechselprozessen eine sehr große Rolle spielen.

Zum Schluß möchte ich noch wenige Worte hinzufügen. Davon ausgehend, daß Katalase im Organismus überhaupt so sehr verbreitet ist, darf man glauben, daß sie die Rolle einer Bremse, eines Regulators der vielleicht in einigen Fällen zu energisch vor sich gehenden Oxydationsprozesse in verschiedenen Geweben spielen könnte.

Aber andererseits, wenn wir an die Möglichkeit eines Übergangs der Katalase in die Peroxydase denken, so können wir uns vorstellen, daß der Organismus imstande ist, bei verschiedenen Reaktionsbedingungen und wechselnden Massenverhältnissen der reagierenden Stoffe, *mit einem und demselben Stoff* — sei es „Ferment", sei es „ein Stoff mit fermentativen Eigenschaften" — die Reaktionen in verschiedenen, sogar in entgegengesetzten Richtungen auszuführen.



Bemerkungen über das Rhodankobalt als mikrochemisches Reagens.

Von

Justin Greger.

(Aus dem Institut für Botanik, Warenkunde und Techn. Mikroskopie der deutschen Technischen Hochschule, Prag.)

(Eingegangen am 22. April 1927.)

Es ist seit langem bekannt, daß die Lösungen der *Rhodanide* an den Stärkekörnern Quellungen hervorrufen. *Casparis*[1]) hat für den Nachweis verholzter Membranen das Rhodankobalt [*Kobaltorhodanid*, $Co(SCN)_2 . 4 H_2O$] empfohlen. Doch fand *Molisch*[2]), daß durch dieses Reagens nicht nur Verholzungen gefärbt werden, sondern auch andere Zellinhaltsstoffe, wie z. B. Stärke und Eiweißkristalle. Nach seiner Ansicht handelt es sich bei diesen Färbungen um Adsorptionserscheinungen. Läßt man zu den gefärbten Präparaten Wasser zufließen, so tritt eine vollständige Entfärbung ein. Färbung und Entfärbung lassen sich nach Belieben oft wiederholen. Verwendet wird eine 20- bis 40% wässerige Lösung. Die *Herstellung* erfolgt auf folgende Art:

Eine konzentrierte Lösung von Kobaltsulfat wird mit einer alkoholischen Rhodankaliumlösung versetzt. Man dampft nun vorsichtig ein und erhält blaue Kristalle, die sich in Wasser leicht lösen.

Es lag nahe, die Eigenschaften des Rhodankobalts für warenkundliche Untersuchungen auszuwerten. Fälschungen mit Holzsubstanzen oder mit verschiedenen holzführenden Verfälschungsmitteln können mit diesem Reagens leicht und vor allem schnell nachgewiesen werden. Obwohl meines Erachtens andere Holzreaktionen empfindlicher sind, spricht für die Verwendung des Rhodankobalts außerdem noch ein Umstand: trotz allem kommen im Praktikumsbetriebe immer wieder

---

[1]) *P. Casparis*, Beiträge zur Kenntnis verholzter Membranen. Pharmazeutische Monatshefte, Beibl. z. pharm. Post 1920.

[2]) *H. Molisch*, Mikrochemie der Pflanze. 2. Aufl. Jena 1921.



Benetzungen der Mikroskop-Frontallinsen, Verbrennungen u. a. mit Säuren vor; die Rhodankobaltreaktion schließt jedes Gefahrmoment in dieser Richtung aus.

Bei meinen Untersuchungen haben sich aber überdies noch Eigenschaften gezeigt, welche die Verwendungsmöglichkeit dieses Reagens bedeutend erweitern. Stellen wir uns ein mindestens 50% Rhodankobalt her, so geht die *Stärke* oder, genauer gesagt, der wasserlösliche Anteil derselben *fast sofort in Lösung.* Mit dieser Fähigkeit tritt das Rhodankobalt in die Reihe jener Reagenzien, welche für die Untersuchung von Mehlen und von Mahlprodukten im weiteren Sinne unentbehrlich geworden sind[1]). Der unverkennbare Wert liegt aber nicht allein darin, daß die Stärke, ohne Erwärmung des Präparats, so weit gelöst wird, daß sie im mikroskopischen Bilde ganz zurücktritt, sondern es erfolgt auch eine *Aufhellung* und *Färbung* der Kleiefragmente, ohne daß eine nennenswerte Quellung damit im Zusammenhang stünde.

Wie wirkt nun Rhodankobalt auf das Stärkekorn? Am besten läßt sich der Verlauf der Reaktion an der Kartoffelstärke beobachten. Vor allem erfolgt eine Quellung des Stärkekornes. Es traten Risse auf (Korrosion), die Schichtung wird immer undeutlicher und verschwindet endlich vollständig. Schließlich reißt die äußerste, widerstandsfähige Schicht auf und der durch das Reagens angegriffene Inhalt tritt aus, um sich vollständig zu lösen. Das Kornskelett schrumpft nun zusammen, es bilden sich Falten und Drehungen. Die äußere Form des Stärkekorns wird dadurch mehr oder minder verändert. Die Art und die Schnelligkeit des Reaktionsverlaufs hängt von der Konzentration des Reagens ab.

Reagenzien, welche Stärke gleichfalls lösen, wurden von *Netolitzky*[2]) und von *Plahl*[3]) in neuerer Zeit beschrieben. *Netolitzky* verwendet alkoholische Kalilauge, *Plahl* gesättigte, wässerige Silbernitratlösung.

Rhodankobalt hat nun, wie schon erwähnt wurde, weiter die angenehme Eigenschaft, Gewebeteile aufzuhellen und zu färben. Die Querzellen der Weizen- und der Roggenfruchtschale werden blaugrün gefärbt, während sich die Längszellen hellrosa färben. Die Zellwände der Kleberschicht nehmen eine rosa, der Zellinhalt eine blaugrüne Färbung an. Es hat den Anschein, als ob sich das Aleuronkorn vollständig färben würde. Die Spelzenteile der Gerste, des Hafers u. a. werden ebenfalls blaugrün gefärbt. Wenn der Mehlkörper in größeren

---

[1]) Siehe auch *J. Greger,* Mikroskopie der landwirtschaftlichen Unkrautsamen. Berlin 1927.

[2]) *F. Netolitzky,* Tschirch-Festschrift 1926.

[3]) *W. Plahl,* Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie u. f. mikroskop. Technik **40**, 1923.

Aggregaten liegt (griffige Mehle), so werden diese blau gefärbt, doch verschwindet die Färbung mit der fortschreitenden Lösung der Stärke.

Ausreuter wurden gleichfalls auf ihr Verhalten zu Rhodankobalt geprüft. Besonders auffallend ist der Farbumschlag der braunen Pigmente. Diese nehmen eine prachtvoll carminrote Färbung an (Testa von *Agrostemma githago*). Auch bei der Untersuchung von Gewürzen konnte dieser Vorgang beobachtet werden. Die Pigmentzellen der Leinsamenschale heben sich infolge dieser Färbung ganz prachtvoll von den sonst blaugrün gefärbten Samenfragmenten ab.

Netolitzky (l. c.) hat gefunden, daß bei verschiedener Konzentration der alkoholischen Kalilauge unterschiedliche Stärke gegen die Lösung ungleichartigen Widerstand leistet, so daß eine quantitative Schätzung der Anteile eines Gemischs möglich ist. Dieselbe Beobachtung habe ich vor Jahren bei der Anwendung von Rhodankobalt gemacht. Es lassen sich z. B. durch entsprechende Konzentration sogar mehrere Leguminosenstärken differenzieren. Doch will ich nicht behaupten, daß meiner Beobachtung eine große praktische Bedeutung zukommt, um so weniger, als ich feststellen konnte, daß das Alter der Ware nicht ohne Einfluß auf das Lösungsvermögen des Rhodankobalts ist. Auch der Wassergehalt der Ware spielt eine Rolle.

Interessant ist, daß die Großkörner der verschiedenen Stärkesorten viel stärker angegriffen werden, als die Kleinkörner. Bei mäßigeren Konzentrationen des Reagens quellen die Kleinkörner der Getreidemehle, der Leguminosenstärke, der Kartoffelstärke nur mehr weniger auf, während die Großkörner stark beeinflußt werden.

Des weiteren habe ich versucht, *mikrochemisch* nachzuweisen, welche Stärkeanteile durch Rhodankobalt gelöst werden. Lassen wir nach der Einwirkung des Reagens Jodtinktur zutreten, so erfolgt eine intensive Blaufärbung. Entfernen wir die gelösten Anteile, indem wir durch das Präparat wiederholt Wasser ziehen, so werden die zurückbleibenden Kornskelette durch die Jodtinktur rotviolett gefärbt. Eine weitere Farbendifferenzierung konnte ich nicht beobachten. Der im Reagens gelöste (wasserlösliche) Anteil des Stärkekornes wird also durch Jod rein blau, der unlösliche Teil rotviolett gefärbt.

Wenn wir die Untersuchungsergebnisse von *Maquenne* zugrunde legen, so wäre der lösliche Teil die *Amylose* (Blaufärbung), der unlösliche Anteil — das Kornskelett — das *Amylopektin* (Rotviolettfärbung).

Anschließend sei noch erwähnt, daß das Rhodankobalt für den *Nachweis von Kakaoschalen* gut verwendbar ist. Wird ein Wasserpräparat bis zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen und möglichstem Entwässern mit Rhodankobalt behandelt, so färbt sich der Schleim

(Schleimzellen) rosa- bis feuerrot. Diese Färbung ist so stark kontrastierend, daß ein Übersehen unmöglich ist.

Zusammenfassend ergibt sich: Rhodankobalt ist ein brauchbares Reagens für die Untersuchung und Begutachtung von Mehlen und Mahlprodukten, sowie von anderen Lebensmitteln und Futtermitteln. Die wasserlöslichen Anteile der Stärke (Amylose) werden gelöst, Gewebeteile aufgehellt und je nach ihrer chemischen Beschaffenheit gefärbt. Rhodankobalt ermöglicht nicht nur ein schnelles, sondern auch ein gefahrloses Arbeiten. Überfärbungen lassen sich durch Wasserzusatz sofort ausgleichen.

Beiträge zur Physiologie überlebender Säugetierherzen.

II. Mitteilung:

Vergleichende Bestimmung des Zuckerverbrauchs überlebender Katzenherzen, ausgeführt mit älteren Apparaten und mit dem verbesserten Locke-Rosenheimschen Apparat.

Von

Georg Ambrus.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 23. April 1927.)

Bei der eminenten Wichtigkeit, die einer genauen Kenntnis des Zuckerverbrauchs des überlebenden Säugetierherzens zukommt, mußte es seit längerem als störend empfunden werden, daß nicht nur die von verschiedenen Autoren mitgeteilten Werte große Unterschiede aufweisen, sondern auch die, die von ein und *demselben Autor* an verschiedenen Individuen *derselben Tierart* mit derselben Methodik erhalten wurden. In einer vorangehenden Mitteilung[1]) haben wir bloß kurz erwähnt, daß man mit dem *Locke-* und *Rosenheim*schen Apparat in seiner ursprünglichen Form keine befriedigenden Ergebnisse erhält; gleichzeitig haben wir eine Modifikation dieses Apparats angegeben, von dem bessere Resultate zu erwarten waren.

In gegenwärtiger Mitteilung soll nun ausführlicher gezeigt werden, wie die mit den älteren Einrichtungen, darunter auch mit dem ursprünglichen *Locke-* und *Rosenheim*schen Apparat, von anderen und auch von mir erzielten Resultate beschaffen sind, und wie weit sie von den mit unserem modifizierten Apparat erreichten Resultaten übertroffen werden.

A. Versuche früherer Autoren.

Nachstehend sind die Angaben früherer Autoren zusammengestellt, jedoch nur insofern sie sich auf das Katzenherz, dem für derlei Versuche am besten geeigneten Objekt, beziehen. Die Werte sind teils von den betreffenden Autoren selbst, teils aber von mir berechnet.

---

[1]) *Z. Aszódi* und *G. Ambrus*, diese Zeitschr. **188**, 408, 1927.

	Traubenzuckerverbrauch pro Std. und g feuchten Herzgewichts mg	Versuchseinrichtung bzw. Apparatur
Camis[1]	0	*Langendorff*
Rohde[2]	1,2 —3,3	Eigener Apparat
Hamburger[3]	3,1 —6,1	*Langendorff*
	0,7 —2,7	*Locke-Rosenheim*
Neukirch und *Rona*[4]	0 —0,7	" "
Knowlton und *Starling*[5]	4,2 —5,1	Herz-Lungen-Präparat
Cruickshank u. *Patterson*[6]	0,25—4,0	Eigener Apparat
Burn und *Dale*[7]	1,9 —3,7	*Locke-Rosenheim*
Mansfeld und *Geiger*[8]	0,8 —3,2	" "

Aus obiger Zusammenstellung ist ersichtlich, daß keiner der angeführten Werte vermöge seiner Häufigkeit als charakteristisch bzw. als der eigentlich richtige angesehen werden kann; denn ganz geringe Werte von 0,25 mg wechseln mit solchen bis zu 6,1 mg, und kann es keinem Zweifel unterliegen, daß die Ursache dieser Diskrepanzen nicht den so beliebten individuellen Schwankungen zugeschrieben werden kann, sondern in technischen Fehlern, sei es der verwendeten Apparatur, sei es in der Ausführung der Versuche gelegen sein muß. Als solche Fehler kommen, wie in unserer erwähnten Mitteilung ausführlich dargelegt wurde, die folgenden in Betracht: ungenügende Menge der Flüssigkeit, von der die Herzgefäße durchströmt werden; damit im Zusammenhang ungenügende Speisung des Herzens mit Sauerstoff; nicht entsprechende Temperatur und ungenügender Druck, mit der die Speiseflüssigkeit bei den Coronarien eintritt.

B. Eigene Versuche an Katzenherzen.

Versuche mit dem Locke-Rosenheimschen Apparat in seiner ursprünglichen Form. Da es vor allem ausgeschlossen werden mußte, daß die Abnahme der Zuckerkonzentration, aus der doch der Zuckerverbrauch berechnet wird, zu einem geringeren oder größeren Anteil von außerhalb des Herzens gelegenen Momenten, wie etwa von Analysenfehlern oder von einer bakteriellen Zersetzung des Zuckers, herrührt, habe ich drei

---

[1]) *Camis*, Zeitschr. f. allgem. Physiol. **8**, 371, 1908.
[2]) *Rohde*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **68**, 181, 1910.
[3]) *Hamburger*, Magyar Orvosi Archivum (ungarisch) **11**, 279, 1911.
[4]) *Neukirch* und *Rona*, Pflügers Arch. **148**, 285, 1912.
[5]) *Knowlton* und *Starling*, Journ. of Physiol. **45**, 146, 1912/13.
[6]) *Cruickshank* und *Patterson*, ebendaselbst **47**, 381, 1914.
[7]) *Burn* und *Dale*, ebendaselbst **59**, 170, 1924.
[8]) *G. Mansfeld* und *E. Geiger*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **106**, 285, 1925.

Tabelle I.

Nr. des Versuchs	Datum des Versuchs 1923	Geschlecht	Körpergewicht g	Feuchtes Herzgewicht g	Dauer des Versuchs	Zuckerverbrauch pro Std. u. g feuchten Herzgewichts mg	Bemerkungen
1	21. XII.	—	—	—	7h30′	0	Blindversuche: *Ringer-Locke* mit 0,1% Traubenzucker
2	31. XII.	—	—	—	6	0	
	1924						
3	17. IV.	—	—	—	8	0	
4	19. I.	?	3885	16,8	6 45	1,0	*Ringer-Locke* mit 0,1% Traubenzucker
5	7. II.	?	2210	11,8	8	2,8	
6	11. II.	?	2315	9,2	8 30	2,5	
7	15. II.	?	3650	16,7	7	2,4	
8	10. III.	?	1430	6,4	7 45	0,5	
9	14. III.	weiblich	2250	11,7	6 15	1,9	
10	22. III.	männlich	3370	14,7	5 45	1,8	
11	9. IV.	weiblich	2850	12,6	7	1,0	
12	14. IV.	männlich	3220	16,7	6	1,0	
13	1. V.	„	2360	14,9	6 30	2,0	
14	16. V.	„	3570	21,6	6	2,3	Tyrode mit 0,1% Traubenzucker
15	19. V.	weiblich	2250	10,9	6	7,0	
16	4. VI.	männlich	3080	16,6	6 15	2,0	

Blindversuche, Nr. 1 bis 3 (darunter den dritten streng steril), ausgeführt, indem ich die Speiseflüssigkeit, wie in einem richtigen Versuch, im Apparat 6 bis 8 Stunden lang kreisen ließ, jedoch ohne ein Herz einzulegen. Diese Versuche führten, wie aus Tabelle I hervorgeht, zu einem negativen Ergebnis.

In den nun folgenden Versuchen 4 bis 16 habe ich Katzenherzen in den Apparat eingebracht und nach einer angemessenen Zeit den Zuckerverbrauch bestimmt. Die ebenfalls in Tabelle I zusammengestellten Ergebnisse dieser Versuche, von denen Nr. 8 bis 16 nach vorangehender sorgfältiger Hitzesterilisation der gläsernen Bestandteile des Apparats ausgeführt wurden, sind nicht besser als die der oben angeführten Autoren. Der Zuckerverbrauch schwankte zwischen 0,5 und 7 mg.

Es war uns klar, daß bessere Resultate nur zu erhalten sein werden, wenn es gelingt, die vermuteten Fehlerquellen gänzlich oder teilweise auszuschalten. Dies war natürlich nicht sofort, sondern nur etappenweise möglich, und soll nun der Reihe nach gezeigt werden, wie die anfangs schlechten Resultate später durch bessere abgelöst und endlich mit dem definitiven Modell des verbesserten Apparats Resultate erzielt wurden, die wenigstens zunächst als befriedigend angesehen werden können.

Herzbehälter und Spirale mit der in das Herz einströmenden Flüssigkeit von einem Wasserbad umgeben. Von der Beobachtung ausgehend,

daß die Speiseflüssigkeit in der Spirale wohl die richtige Temperatur angenommen hatte, jedoch knapp vor ihrem Eintritt in die Herzkanüle oft wesentlich kühler war, habe ich in den Versuchen 17 bis 32 denselben Apparat verwendet, jedoch mit dem Unterschied, daß der glockenförmige Behälter, in dessen Hohlraum das Herz aufgehängt war, sowie der Teil der Glasröhrenleitung, die dem Herzen die Speiseflüssigkeit unmittelbar zuführte, von einem bei Körpertemperatur gehaltenen Wasserbad umgeben waren. In ähnlicher Absicht wurden Verbesserungen am Apparat auch von *Verzár* und *Vásárhelyi*[1]) angebracht. Von dem richtigen Gang der Analyse habe ich mich auch hier durch Blindversuche (Nr. 17 und 18 der Tabelle II) überzeugt. Auch habe ich in diesen Versuchen, um größere Ausschläge zu erhalten, bloß 125 ccm Speiseflüssigkeit verwendet und in den meisten dieser Versuche den Zuckerverbrauch in zwei, in einigen Versuchen gar in drei Perioden bestimmt. Das Ergebnis war, wie aus Tabelle II hervorgeht, wieder nicht besser: auch hier wechselten niedere Werte bis zu 0,3 mg herunter mit solchen bis zu 4,5 mg hinauf.

Tabelle II.

Nr. des Versuchs	Datum des Versuchs 1924	Geschlecht	Körpergewicht g	Feuchtes Herzgewicht g	Dauer der Versuchsperioden	Zuckerverbrauch pro Std. u. g feuchten Herzgewichts mg			Bemerkungen
17	2. XII.	—	—	—	7^h	0			Blindversuche; Tyrode m. 0,1 % Traubenzucker
18	4. XII.	—	—	—	$6^h30'$	0			
19	19. XII.	männlich	3230	10,0	2^h, 4^h	2,0	0,5	—	Tyrode mit 0,1 % Traubenzucker
	1925								
20	25. I.	weiblich	2510	9,1	1^h	1,1	—	—	
21	13. II.	„	3200	14,0	2^h, 4^h	1,3	1,0	—	
22	3. III.	„	1230	8,7	2^h, 2^h, 2^h	4,5	1,7	1,0	
23	6. III.	„	1880	8,5	2^h, $2^h10'$	0,5	0,9	—	
24	7. III.	„	2930	15,2	2^h, 2^h, 2^h	0,3	0,4	0,5	
25	8. III.	„	1980	12,5	$1^h40'$, 2^h, 2^h	2,5	0,9	0,2	
26	10. III.	männlich	3080	12,2	$1^h30'$	0,6	—	—	
27	13. III.	weiblich	1990	9,7	2^h, 4^h	2,7	1,2	—	
28	16. III.	„	1950	8,8	2^h, 1^h, 3^h	3,2	3,2	0,6	
29	18. III.	„	4150	23,6	2^h	1,3	—	—	
30	23. III.	männlich	3190	19,2	2^h, 4^h	2,1	0,6	—	
31	25. III.	„	3250	16,4	2^h	2,8	—	—	
32	27. III.	weiblich	2140	10,8	2^h	3,1	—	—	

Herzgefäße vollkommen rein von Blut gewaschen; Speiseflüssigkeit periodenweis gewechselt; den Druck, mit der die Speiseflüssigkeit in die Coronarien eintritt, erhöht. Die oben beschriebenen Versuche habe ich

[1]) *F. Verzár* und *B. Vásárhelyi*, Magyar Orvosi Archivum **24**, 239, 1923 (Ungarisch).



an Herzen ausgeführt, die, ohne richtig durchgespült zu sein, in den Apparat eingelegt werden mußten, da der immerfort wiederholte Versuch einer vorangehenden Durchspülung durch die Coronararterien meistens vollkommen fehlgeschlagen war. Die bei diesen Bemühungen erworbene Übung verhalf aber dazu, daß die Spülung, wenigstens in einem Teile der nun zu berichtenden Versuche (Nr. 33 bis 45), besser gelang. Im übrigen unterscheiden sie sich von den vorangehenden darin, daß im Sinne der *Rohde*schen Befunde durch Verlängerung des Glasröhrensystems nach oben statt des bisher verwendeten Druckes von 45 mm Hg, mit der die Speiseflüssigkeit in das Herz eintrat, ein Druck von 70 mm Hg erreicht wurde; sowie auch darin, daß zur Ausschaltung etwaiger schädlicher Ermüdungsstoffe und, um den Herzen wieder eine adäquate Zuckerkonzentration zu bieten, die Speiseflüssigkeit nach 2 Stunden — zuweilen nach weiteren 2 Stunden noch einmal — erneuert wurde. (In den Versuchen 33 bis 35 hat eine solche Erneuerung nicht stattgefunden; in Versuch 40 wurde der Tyrodelösung Oxyhämoglobin beigemischt.)

Der Erfolg war, wie aus Tabelle III hervorgeht, ein recht befriedigender, indem ein unterhalb 2 mg gelegener Wert nur einmal, Werte unter 3 mg viermal vorkamen, während in allen übrigen Versuchen Werte zwischen 3 bis 7 mg erhalten wurden.

Versuche mit dem definitiven Modell des verbesserten Apparats. Unser verbesserter Apparat in seiner definitiven Ausführung ist in der bereits mehrfach erwähnten Mitteilung ausführlich beschrieben. Hier sei nur kurz folgendes wiederholt. Das Prinzip der *Locke-Rosenheim*schen Apparatur, die aus dem Herzen abströmende Speiseflüssigkeit durch denselben O_2-Strom, der zu ihrer O_2-Sättigung dient, auf eine gewisse Höhe zu heben und ihr auf diese Weise ein entsprechendes Druckgefälle zu geben, mit dem es in das Herz eintreten soll, ist auch bei sorgsamster Durchführung mit so manchen Unzukömmlichkeiten verbunden. Daher schien es geraten, in den nunmehr ausgeführten Versuchen 46 bis 52 das Emporheben der Speiseflüssigkeit durch ein Pumpwerk besorgen zu lassen, den O_2-Strom jedoch einerseits zur Sättigung der Speiseflüssigkeit, andererseits dazu zu verwenden, daß letztere unter einem konstanten Druck von 110 mm Hg in das Herz eintrete. Auch gelang es nunmehr, durch Verwendung eines Druckes von 80 mm Hg jedesmal, das in situ befindliche Herz von einer Jugularis her durch die Coronararterien gründlich auszuwaschen.

Auf diese Weise wurden die Versuche 46 bis 52 ausgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle IV zusammengestellt sind. Zu bemerken ist noch, daß ich a) mit Ausnahme der Versuche 47, 48 und 49 die Speiseflüssigkeit periodenweise gewechselt und b) in den Versuchen 47, 48 und 49 als

Tabelle III.

Nr. des Versuchs	Datum des Versuchs 1925	Geschlecht	Körpergewicht g	Feuchtes Herzgewicht g	Dauer der Versuchsperioden	Zuckerverbrauch pro Std. und g feuchten Herzgewichts mg			Bemerkungen
33	31. III.	männlich	2320	12,7	2h	1,8	—	—	Tyrode mit 0,1 % Traubenzucker
34	3. IV.	"	1840	12,9	2h, 2h	2,8	3,2	—	" " 0,2 % "
35	8. IV.	weiblich	2550	17,1	2h, 2h	2,2	4,2	—	" " 0,2 % "
36	22. IV.	männlich	4300	19,1	2h, 1h30'	3,3	3,4	—	" " 0,2 % "
37	27. IV.	"	2830	17,6	2h, 4h20'	3,6	2,5	—	" " 0,2 % "
38	1. V.	"	3480	17,8	2h	3,0	—	—	" " 0,2 % "
39	4. V.	weiblich	1710	9,5	2h, 2h, 2h	6,3	6,5	6,5	" " 0,2 % "
40	11. V.	"	2100	13,2	2h, 1h50'	5,3	6,6	—	" " 0,2 % " u. Hämoglobin
41	15. V.	männlich	3270	16,3	2h, 1h30', 2h30'	4,4	5,6	3,7	" " 0,2 % "
42	3. VI.	weiblich	1700	8	2h, 2h	3,5	3,8	—	" " 0,3 % "
43	10. VI.	"	3330	19,3	2h, 2h	2,9	2,8	—	" " 0,3 % "
44	14. IX.	"	3050	10,4	1h25', 1h	2,4	7,0	—	" " 0,2 % "
45	22. IX.	"	2360	10,8	2h, 4h20'	5,2	6,2	—	" " 0,2 % "

Tabelle IV.

Nr. des Versuchs	Datum des Versuchs 1925	Geschlecht	Körpergewicht g	Feuchtes Herzgewicht g	Dauer der Versuchsperioden	Zuckerverbrauch pro Std. und g feuchten Herzgewichts mg			Bemerkungen
46	26. IX.	weiblich	3250	11,9	1h	7,7	—	—	Tyrode mit 0,2 % Traubenzucker
47	1926 13. IV.	"	2850	13,6	1	6,4	3,8	2,6	*Fleisch*sche Lösung mit 0,2 % Traubenzucker ohne periodenweisen Flüssigkeitswechsel
48	16. IV.	"	2530	9,7	1	5,8	2,2	2,0	
49	22. IV.	männlich	3750	12,8	1	7,1	2,7	0,7	
50	27. IV.	weiblich	1950	10,5	1	6,6	7,7	6,4	Tyrode mit 0,2 % Traubenzucker
51	30. IV.	männlich	3400	17,7	1	7,9	7,5	—	
52	3. V.	"	3080	13,8	1	7,3	6,1	4,2	

Speiseflüssigkeit nicht Tyrode-, sondern *Fleisch*sche Lösung[1]) verwendet habe.

Diese Versuche hatten, wie aus Tabelle IV zu ersehen ist, vollen Erfolg. *Der Zuckerverbrauch war wesentlich höher* als in den Versuchen der eingangs erwähnten Autoren sowie auch in meinen eigenen mit der unvollkommenen Methodik ausgeführten Versuchen; und, was ebenso wichtig ist, zeigen meine an einer Anzahl von Katzenherzen erhobenen Werte auch eine verhältnismäßig *hinreichende Konstanz.* (Selbstverständlich muß hierbei von der zweiten und dritten Periode in den Versuchen 47 bis 49 abgesehen werden, da hier die Speiseflüssigkeit nicht gewechselt wurde.) Im Durchschnitt erhielt ich an *den 10 bis 18 g* schweren Herzen der 2 bis 3 kg schweren Katzen einen Wert von etwa 7 mg pro 1 Stunde und 1 g Herzgewicht.

Es fragt sich nun, wie diese neueren, höheren Werte einzuschätzen sind? Hat man aus dem Umstande, daß sie höher sind als die der früheren Autoren, das Recht, sie als die richtigeren anzusehen? bzw. läßt sich aus diesen Werten auf die Größe des Zuckerverbrauchs des Herzens eines normalen, lebenden Tieres folgern? Die Zuckerbestimmungen selbst habe ich in diesen Versuchen genau in der Weise vorgenommen wie an den eingangs beschriebenen, daher der größere Zuckerverbrauch nicht durch einen Analysenfehler vorgetäuscht sein kann. Daß aber der Zuckerverbrauch höher ausfiel, ist bei der besseren Speisung des Herzens mit Sauerstoff und mit gelösten festen Bestandteilen ohne weiteres erklärlich. Es ist also nicht daran zu zweifeln, daß die von mir erzielten höheren Werte die richtigeren sind. Eine andere Frage ist die, ob diese höheren Werte auch wirklich endgültig richtig sind? Vorsichtshalber möchte ich sie zunächst bloß als Minimalwerte angesehen haben, und zwar auf Grund der Erkenntnis, daß die von mir verwendete Apparatur auch in ihrer letzten vervollkommneten Ausführung die Bedingungen, wie sie im lebenden Tiere vorhanden sind, dem Herzen bloß in mehr oder minder grober Annäherung bieten kann.

Gegen die Richtigkeit der von mir mitgeteilten hohen Zuckerverbrauchswerte könnte der allerdings von vornherein ungerechtfertigte Einwand erhoben werden, daß die Bestimmung der Zuckerkonzentrationen mit dem *Bang*schen Mikroverfahren (in seiner neueren Form) und nicht nach *Bertrand* erfolgte; durch ersteres aber die Konzentration aller reduzierbaren Stoffe, durch letzteres aber nur die des gesuchten Zuckers erhalten wird. Daß aber durch diesen Umstand die Folgerungen, die ich aus meinen Versuchen zog, nicht berührt werden, geht aus folgendem hervor:

---

[1]) *A. Fleisch*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **94, 22, 1922.**

In einem an anderer Stelle später mitzuteilenden Versuch betrug

	nach *Bang* %	nach *Bertrand* %
die Anfangskonzentration	0,203	0,205
„ Konzentration am Ende der 1. Periode	0,102	0,098
„ „ „ „ „ 2. „	0,135	0,131
„ „ „ „ „ 3. „	0,174	0,169

Die Unterschiede betrugen also 4% in maximo, und zwar ständig in dem Sinne, daß die Flüssigkeit nach dem Durchgang durch das Herz nach *Bang* bestimmt mehr an reduzierender Substanz enthielt, als nach *Bertrand*, d. h. vom Herzen offenbar reduzierende Stoffe an die Flüssigkeit abgegeben werden. Ist aber dem so, dann ist der Zuckerverbrauch nach *Bang* bestimmt von mir kleiner gefunden worden, als er in der Tat ist, denn die Subtraktion dieses größeren Wertes von dem der Anfangskonzentration ergibt einen geringeren Wert als er eigentlich zu erhalten gewesen wäre. Mithin sind die von mir mitgeteilten auffallend großen Zuckerverbrauchswerte, wenn überhaupt fehlerhaft, eher kleiner als der Wirklichkeit entspricht; keinesfalls aber größer.

Dasselbe ergab sich auch aus einem zweiten, ebenfalls an anderer Stelle später mitzuteilenden Versuch. Hier betrug

	nach *Bang* %	nach *Bertrand* %
die Anfangskonzentration	0,202	0,204
„ Konzentration am Ende der 1. Periode	0,140	0,131
„ „ „ „ „ 2. „	0,116	0,110
„ „ „ „ „ 3. „	0,125	0,118

Beiträge zur Physiologie überlebender Säugetierherzen.

III. Mitteilung:

Über den Zuckerverbrauch verschieden großer Herzen als Funktion der Körperoberfläche oder des Körpergewichts.

Von

Zoltán Aszódi.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 23. April 1927.)

Die sehr befriedigenden Resultate, die laut *Ambrus'*[1]) vorangehender Mitteilung mit unserem verbesserten *Locke*- und *Rosenheim*schen Apparate[2]) betreffs des Zuckerverbrauchs überlebender Katzenherzen erzielt werden konnten, und die von den bisher aus der Literatur bekannt gewordenen Daten wesentlich abweichen, ließen es wünschenswert erscheinen, die Versuche an Katzenherzen durch weitere zu ergänzen und ähnliche Versuche an Herzen anderer Säugetiere auszuführen.

A. Einrichtung und Methodik der Versuche.

Es wurde der Traubenzuckerverbrauch von Katzen-, Hunde-, Kaninchen-, Meerschweinchen- und Rattenherzen bestimmt. Die Tiere ließ ich 24 Stunden vor Versuchsbeginn hungern, ohne auf eine bestimmte Art ihrer vorangehenden Ernährung bedacht zu sein. Die Entblutung der mit Äther narkotisierten Tiere bei der Carotis, das Auswaschen ihres Blutgefäßsystems bei der Jugularis mit körperwarmer, zuckerfreier Tyrodelösung unter einem Druck von 80 mm Hg, das Einbinden der Kanüle in den Aortenstumpf usw. geschah, wie es in unserer erwähnten Mitteilung beschrieben ist. An Meerschweinchen und Ratten mußte von dieser Methode insofern abgegangen werden, als es nicht möglich war, in ihre Carotis und Jugularis Kanülen einzubinden; diese Tiere wurden nach Eröffnung der Bauchhöhle durch die Aorta entblutet, die Waschflüssigkeit aber wurde bei der Cava eingegossen.

Als Speiseflüssigkeit diente eine 0,1 %ige Traubenzucker enthaltende Tyrodelösung in den Ratten- und Meerschweinchenversuchen, eine 0,2 %ige in allen anderen Versuchen; im ersterwähnten Falle aus dem Grunde,

---

[1]) *G. Ambrus*, diese Zeitschr. **185**, 442, 1927.

[2]) *Z. Aszódi* und *G. Ambrus*, ebendaselbst **183**, 408, 1927.

damit bei dem zu erwartenden geringen Verbrauch die Änderung der Zuckerkonzentration noch eine hinreichend große bleibe, um brauchbare Resultate zu liefern; im zweiterwähnten Falle aber, damit infolge des zu erwartenden großen Zuckerverbrauchs die Konzentration der Lösung nicht unter einen von dem physiologischen zu weit entfernten Werte abfalle. Im übrigen haben *Rona* und *Wilenko*[1]) gezeigt, daß es für den Zuckerverbrauch des Herzens irrelevant ist, ob ihm eine Zuckerkonzentration von 0,094 oder 0,376% geboten wird. Tyrodelösung haben wir in allen unseren Versuchen aus dem Grunde verwendet, weil dessen H-Ionenkonzentration in der Höhe von $p_H = 7{,}70$ der des Blutes in der Höhe von $p_H = 7{,}40$ näher steht, als die der *Locke*schen Lösung mit $p_H = 6{,}70$; *Rona* und *Wilenko* aber fanden, daß das Herz sich zwar auch weiter gut kontrahiert, wenn man die H-Ionenkonzentration auf $p_H = 6{,}9$ oder gar auf $p_H = 6{,}4$ erhöht, der Zuckerverbrauch aber auf einen minimalen Wert abfällt. Von den so bereiteten Lösungen wurden 100 ccm an Ratten und Meerschweinchen, 125 ccm an Katzen und Kaninchen, 150 ccm an Hunden verwendet. Der Druck, unter dem die Flüssigkeit in die Coronarien eintrat, betrug in allen Versuchen 110 mm Hg. Alle Versuche wurden prinzipiell in mehrere Perioden eingeteilt ausgeführt; meistens gelang es, drei Perioden zu Ende zu führen, nur einige Male mußte der Versuch infolge Herzstillstandes nach der zweiten Periode abgebrochen werden. Zwischen je zwei Perioden wurde die Speiseflüssigkeit in der vorgeschriebenen Weise gewechselt und unterdessen das Herzgefäßsystem durch 2 bis 4 Minuten mit zuckerfreier Tyrodelösung durchgespült.

Um etwaige Zusammenhänge zwischen Zuckerverbrauch und gewissen innerhalb oder außerhalb des Herzens gelegenen Momenten festzustellen, habe ich in jeder Periode mehrmals Temperatur und Strömungsgeschwindigkeit der bei der Herzkanüle eintretenden Flüssigkeit, die Herzfrequenz, sowie in mehreren Versuchen auch die H-Ionenkonzentration der Speiseflüssigkeit zu Beginn und am Ende des Versuchs bestimmt. Zu letzterem Behufe bediente ich mich der Indikatorenmethode ohne Puffer von *Michaelis-Gyémánt* in der Modifikation von *Holló* und *Weiss*[2]).

Am Ende jedes Versuchs ließ ich, um das Herzgewicht festzustellen, die anhaftende Flüssigkeit vom Herzen, das noch 2 Stunden lang bei der Kanüle aufgehängt blieb, abtropfen, preßte dann das Herz zwischen Leinwandlappen aus und wog es. Sodann wurde das Herz in der beschriebenen Weise ausgekocht, gereinigt, getrocknet und so seine Trockensubstanz bestimmt.

Bezüglich der Berechnung der Versuchsergebnisse sei bemerkt, daß ich den Zuckerverbrauch einerseits in der üblichen Weise auf 1 Stunde und 1 g des am Ende des Versuchs feucht gewogenen Herzens, außerdem aber auch auf 1 g der Trockensubstanz des gereinigten Herzens reduziert habe, um auf diese Weise die ganz bedeutenden Fehler auszuschalten, die von der nie fehlenden ödematösen Durchtränkung des Herzens und der dadurch vorgetäuschten Vergrößerung des Herzgewichtes herrühren. Die Zuckerbestimmungen wurden stets nach der neueren *Bang*schen Mikromethode ausgeführt, und zwar sowohl um die Anfangskonzentration der Speiseflüssigkeit als auch die Konzentration am Ende je einer Periode zu ermitteln.

---

[1]) *P. Rona* und *G. G. Wilenko* diese Zeitschr. 59, 173, 1914.
[2]) *J. Holló* und *St. Weiss*, diese Zeitschr. **144**, 101, 1923.

B. Besprechung der Versuchsergebnisse.

Alle Versuchsdaten sind in der Generaltabelle am Ende des Textes enthalten; die Tabellen I, II, III, IV, V und VI, an deren Hand die entsprechenden Schlüsse gezogen wurden, sind im Text untergebracht.

1. Versuche an Katzenherzen.

In der Tabelle I ist der stündliche und auf 1 g des feucht gewogenen Herzens reduzierte Traubenzuckerverbrauch der Katzenherzen verzeichnet, und habe ich zwischen meine Versuche von den *Ambrus*schen diejenigen eingereiht, die mit dem vervollkommneten Apparat und unter denselben Versuchsbedingungen wie die meinigen ausgeführt wurden. (In den *Ambrus*schen Versuchen 47, 48 und 49 diente *Fleisch*sche Lösung als Speiseflüssigkeit, weshalb diese Versuche unberücksichtigt bleiben mußten.) Aus den am Fuße der Tabelle berechneten Mittelwerten ist, soweit es überhaupt gestattet ist, aus so verschiedenen Zahlen einen Mittelwert zu bilden, zu ersehen, daß meine Ergebnisse mit denen von *Ambrus* recht gut übereinstimmen, daher es als endgültig erwiesen erachtet werden kann, daß der *Traubenzuckerverbrauch überlebender Katzenherzen weit größer ist*, als von früheren Autoren angegeben wurde. Er beträgt, wenn man in allen Versuchen die erste

Tabelle I.

Katzenherzen.

Versuch	Herz feucht gewogen g	Zuckerverbrauch pro Std. und g				Herz Trockengewicht g	Zuckerverbrauch pro Std. und g			
		Periode I mg	Periode II mg	Periode III mg	Periode I—II—III mg		Periode I mg	Periode II mg	Periode III mg	Periode I—II—III mg
63	8,5	9,5	9,3	8,4	9,1	0,905	89,5	87,2	80,6	85,8
64	10,3	9,0	5,5	6,4	7,0	1,057	87,9	53,9	62,4	68,1
50	10,5	6,6	7,7	6,4	6,9	1,128	59,3	69,1	57,6	62,0 *)
46	11,9	7,7	—	—	—	—	—	—	—	— *)
52	13,8	7,3	6,1	4,2	5,9	1,588	68,6	53,5	36,5	52,9 *)
65	13,7	6,4	6,4	4,8	5,9	1,575	55,8	55,8	41,9	51,1
66	14,8	6,7	6,6	6,6	6,6	1,751	57,1	56,0	55,4	56,2
51	17,7	7,9	7,5	—	7,7	2,270	59,9	57,4	—	58,7 *)
67	18,7	7,3	5,4	5,4	6,1	—	—	—	—	—
68	20,4	5,5	4,8	—	5,2	1,970	57,3	50,2	—	53,8
69	30,0	4,3	4,2	3,7	4,1	3,368	38,5	37,6	32,6	36,2
Mittelwert aller Versuche.										
		7,1	**6,4**	**5,7**	**6,4**		**63,8**	**57,9**	**52,4**	**58,8**
Mittelwert der eigenen Versuche.										
		6,9	**6,0**	**5,9**	**6,3**		**64,3**	**56,8**	**54,6**	**58,6**
Mittelwert der *Ambrus*schen Versuche.										
		7,4	**7,1**	**5,4**	**6,6**		**62,6**	**60,0**	**47,0**	**56,5**

*) *Ambrus.*

Periode, in der die Herzen aus begreiflichen Gründen dem physiologischen Zustande verhältnismäßig am nächsten sind, *gegen 7 mg pro Stunde und pro 1 g des feucht gewogenen Herzens.*

Daß die in der zweiten bzw. in der dritten Periode erhaltenen Werte fast durchgehends geringer als die der ersten Periode sind, kann obigen Feststellungen keinen Abbruch tun. Wenn man, wie noch weiter unten besprochen werden soll, der verhältnismäßig kurzen Zeitdauer eingedenk ist, während deren das Herz überlebend erhalten werden kann, ist es nicht wunderzunehmen, daß auch der Zuckerverbrauch von Stunde zu Stunde, wenn auch nicht in jedem Versuch in gleichem Grade, abnimmt.

2. Versuche an Ratten-, Meerschweinchen-, Kaninchen- und Hundeherzen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle II zusammengestellt und sollen zunächst mit den Ergebnissen früherer Autoren verglichen werden; was allerdings nur bezüglich der Kaninchen- und Hundeherzen möglich ist.

Tabelle II.

Versuch	Herz feucht gewogen	Zuckerverbrauch pro Std. und g				Herz Trockengewicht	Zuckerverbrauch pro Std. und g			
		Periode I	Periode II	Periode III	Periode I – II – III		Periode I	Periode II	Periode III	Periode I – II – III
	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
					Ratte.					
53	0,7	35,7	34,2	30,0	33,3	0,085	294	282	247	274
54	1,1	22,7	23,6	24,5	23,6	0,167	150	156	162	156
Mittelwert:		**29,2**	28,9	27,3			**222**	219	204	
					Meerschweinchen.					
55	2,0	10,5	12,0	10,0	10,8	0,279	75,3	86,0	71,7	77,7
56	2,2	10,5	10,0	—	10,2	0,270	85,2	81,5	—	83,3
57	2,3	9,5	5,2	5,4	6,7	0,265	83,0	44,2	47,5	58,2
58	2,7	10,4	10,8	7,1	9,4	0,291	96,0	100	65,6	87,2
Mittelwert:		**10,2**	9,5	7,5			**84,9**	77,9	61,6	
					Kaninchen.					
59	3,1	20,3	17,1	23,4	20,3	0,466	135	112	154	134
60	4,9	15,1	13,9	—	14,5	0,597	129	114	—	119
61	6,7	12,2	9,2	9,2	10,2	0,685	120	90,5	90,5	100
62	7,5	8,0	8,5	7,0	7,8	0,780	76,9	82,0	67,9	75,6
Mittelwert:		**13,9**	12,2	13,2			**115**	99,5	104	
					Hund.					
70	44,7	4,3	2,8	2,4	3,5	5,252	36,5	32,4	21,3	30,3
71	46,6	2,1(?)	2,9	3,1	2,7(?)	5,787	16,5(?)	23,3	25,1	21,6(?)
72	56,3	2,9	3,2	3,2	3,1	7,137	23,5	24,9	24,9	24,4
73	77,8	2,6	2,7	2,3	2,5	9,564	21,8	22,3	19,4	21,2
Mittelwert:		**3,3** *)	3,1	2,8			**27,3** *)	25,7	22,7	

*) Ohne Versuch 71, in der Periode I offenbar fehlerhaft ist.

Von den früheren Autoren fanden einen

	Traubenzuckerverbrauch pro Std. und g feuchten Herzgewichts mg	Versuchseinrichtung
An Kaninchen.		
Locke u. *Rosenheim*[1] . . .	1,2 —1,7	*Locke-Rosenheim*scher Apparat
Mansfeld[2]	1,0 —2,9	
Loewy u. *Weselko*[3]	1,5 —2,1	Locke als Speiseflüssigk.
Burn u. *Dale*[4]	0,54—1,82	Modifiz. *L.-R.*-Apparat, verdünntes Blut als Speiseflüssigkeit
Dieselben	1,60—2,48	
Rona u. *Wilenko*[5]	1,9 —3,4	Tyrode als Speiseflüssigk.
Dieselben	1,0 —1,9	Locke als Speiseflüssigk.
Underhill u. *Prince*[6] . . .	0,9—2,9 (1 mal 3,8)	*L.-R.*-Apparat
Verzár u. *Vásárhelyi*[7] . . .	0,50—1,88 (2mal über 4)	
Gayda[8]	3,88-10,20 (2mal üb. 14)	Eigener Apparat
Hepburn u. *Latchford*[9] . .	0,87 (Mittelwert)	*L.-R.*-Apparat
Wilenko[10]	2,2—2,8	
Maclean u. *Smedley*[11] . .	0,5—1,0	
An Hunden.		
Patterson u. *Starliny*[12] . .	0,80—1,80 (2mal über 3)	Herz-Lungen-Präparat
Cruickshank u. *Patterson*[13]	0,27—0,33	
Knowlton u. *Starling*[14] . .	2,8—6,29 (Mittelwert 4)	

Berücksichtigen wir aus den oben angeführten Gründen in jedem Versuch wieder nur die in der ersten Periode erhaltenen Werte und ziehen innerhalb jeder Versuchsgruppe den Mittelwert aus den voneinander allerdings sehr verschiedenen Werten, so erhalten wir für das *Kaninchenherz* den Wert von *14 mg*, für das *Hundeherz* einen solchen von *3 mg*. Es ergibt sich demnach, daß die an Kaninchenherzen von früheren Autoren mitgeteilten Werte *von den meinigen meistens weit übertroffen werden*; nur die von *Gayda* gefundenen kommen den meinigen

[1]) *F. S. Locke* und *O. Rosenheim*, Journ. of Physiol. **36**, 205, 1907/08.
[2]) *G. Mansfeld*, Pflügers Arch. **161**, 430, 1915.
[3]) *O. Loewy* und *O. Weselko*, ebendaselbst **158**, 155, 1914.
[4]) *J. A. Burn* und *H. H. Dale*, Journ. of Physiol. **59**, 164, 1924.
[5]) *P. Rona* und *G. G. Wilenko*, diese Zeitschr. **59**, 173, 1914.
[6]) *F. P. Underhill* und *A. L. Prince*, Journ. of biol. Chem. **17**, 299, 1914.
[7]) *F. Verzár* und *B. Vásárhelyi*, Magyar Orvosi Archivum **24**, 239, 1923.
[8]) *T. Gayda*, Zeitschr. f. allgem. Physiol. **18**, 191, 1912.
[9]) *J. Hepburn* und *J. K. Latchford*, Amer. Journ. of Physiol. **62**, 177, 1922.
[10]) *G. G. Wilenko*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **71**, 260, 1913.
[11]) *H. Maclean* und *J. Smedley*, Journ. of Physiol. **45**, 462, 1912.
[12]) *S. W. Patterson* und *E. H. Starling*, ebendaselbst **47**, 137, 1913/14.
[13]) *E. W. H. Cruickshank* und *S. W. Patterson*, ebendaselbst **47**, 381, 1913/14.
[14]) *F. P. Knowlton* und *E. H. Starling*, ebendaselbst **45**, 146, 1912/13.

nahe. Von den an *Hundeherzen* ausgeführten Versuchen können die von *Knowlton* und *Starling* weder mit denen anderer Autoren, noch mit den meinigen verglichen werden, da sie am Herz-Lungenpräparat ausgeführt wurden; die übrigen *bleiben weit hinter den von mir erlangten zurück*. Es kann also auch hier wie am Katzenherzen ausgesagt werden, daß mit unserem verbesserten *Locke-Rosenheim*schen Apparat *weit bessere* und der Wahrheit näher kommende Resultate, namentlich *weit höhere Werte* erhalten werden können, als mit irgendwelcher der früher verwendeten Apparatur. Bezüglich des Traubenzuckerverbrauchs überlebender *Meerschweinchen* und *Rattenherzen* liegen meines Wissens keine früheren Versuche vor, weshalb hier zunächst nur kurz erwähnt sei, daß die auf ähnliche Weise berechneten Werte für das *Meerschweinchenherz 10 mg*, für das *Rattenherz* aber (auf Grund von bloß zwei Versuchen) *29 mg* betragen.

3. Eine richtigere Berechnung des Zuckerverbrauchs der überlebenden Herzen.

Zu den vorangehenden Besprechungen wurde, da es sich dort um den Vergleich mit den Ergebnissen früherer Autoren handelte, letztere aber stets nur das Gewicht der feucht gewogenen Herzen angeben, immer nur auf die in derselben Weise reduzierten Werte Bezug genommen. Angesichts des Umstandes, daß ich den Wassergehalt aller von mir verwendeten Herzen nach Abschluß des Versuchs zu 10 bis 12% befunden habe, ist es klar, daß die auf das ödematös durchtränkte Herz bezogenen Werte unmöglich ein richtiges Bild vom wirklichen Zuckerverbrauch des Herzens geben können. In Wirklichkeit sind also die von mir oben errechneten Werte zwar an sich schon wesentlich *höher* als die von den früheren Autoren erhaltenen, jedoch infolge des falschen, weil übergroßen Herzgewichts, auf das sie bezogen sind, noch immer *kleiner* als der Wirklichkeit entspricht. Da außerdem die ödematöse Durchtränkung in einem Versuch größer, im anderen geringer war, mußten die Ergebnisse auch eine Verzerrung erfahren haben, die ihre Bewertung erschwert. Aus diesen Gründen habe ich in allen Versuchen den Zuckerverbrauch, vor allem auch auf die Einheit des Herztrockengewichts berechnet und konnte aus diesen Werten ein wenigstens angenähert richtiges Bild vom *Zuckerverbrauch des im normalen Tier schlagenden Herzens* auf Grund der folgenden Überlegung erhalten. Aus den entsprechenden Daten der *Vierordt*schen[1]) Tabelle läßt sich für das menschliche Herz ein durchschnittlicher Trockensubstanzgehalt von rund 20% berechnen. Sofern es nun gestattet ist, diesen Gehalt auch für die verschiedenen Tierherzen anzunehmen, lassen sich die für die Herz-

---

[1]) *H. Vierordt*, Anatomische, physiologische und physikalische Daten und Tabellen. 1906.



trockensubstanz berechneten Werte auf das Herz *mit normal gedachtem Trockensubstanzgehalt* umrechnen. Diese Berechnung habe ich in allen meinen Versuchen ausgeführt und die Mittelwerte nebst den auf das feuchte und das trockene Herz bezogenen Daten in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

Traubenzuckerverbrauch pro Stunde in Milligrammen.

	Pro g feuchter Herzsubstanz	Pro g Herztrockensubstanz	Pro g des normal gedachten Herzens
Rattenherzen	29	222	44
Meerschweinchenherzen .	10	85	17
Kaninchenherzen	14	115	25
Katzenherzen	7	64	13
Hundeherzen	3	27	5

Besagte ödematöse Schwellung wurde bereits von *Locke* und *Rosenheim*[1]), später auch von *Rohde*[2]), angegeben und von ersterem dem Drucke zugeschrieben, unter dem die Speiseflüssigkeit in die Herzgefäße eintritt. Dies ist wohl möglich, doch halte ich es nicht für ausgeschlossen, daß etwa auch die Zusammensetzung der Speiseflüssigkeit die Schuld trägt; und ohne daß ich es zu beweisen oder etwas Besseres vorschlagen könnte, möchte ich auf die Möglichkeit hinweisen, daß vielleicht die osmotische Konzentration, oder die H-Ionenkonzentration, oder aber Art und Konzentration der übrigen Ionen als nicht physiologisch wirksam ist. Wie dem immer sei, der Vorteil, den wir durch Anwendung des hohen Druckes erlangen, wird durch den Nachteil der Schwellung, sofern sie durch den Druck verursacht ist, keineswegs übertroffen.

4. Beziehungen zwischen Traubenzuckerverbrauch und Größe (Gewicht) der überlebenden Herzen.

Am Herzen gleichartiger Tiere. In den Tabellen I und II sind die Versuchsergebnisse für jede Tierart nach ansteigenden Gewichten der Herzen geordnet. Überblickt man die dort verzeichneten Werte, so muß es sofort auffallen, daß, mit Ausnahme des Meerschweinchens, *innerhalb einer Tierart* ein mehr oder minder ausgesprochener Zusammenhang zwischen Zuckerverbrauch und Herzgewicht in dem Sinne besteht, daß auf die Gewichtseinheit des Herzens *ein um so geringerer Zuckerverbrauch entfällt, je größer das Herz ist.*

Dieser Zusammenhang ist, wie aus Tabelle IV hervorgeht, bereits in den von *Verzár* und *Vásárhelyi*[3]) an Kaninchenherzen ausgeführten Versuchen angedeutet und geht klar aus *Gaydas*[4]) ebenfalls an Kaninchenherzen

---

[1]) l. c.
[2]) *E. Rohde,* Zeitschr. f. physiol. Chem. 68, 181, 1910.

Tabelle IV.

Verzár und Vásarhelyi			*Gayda*		
Versuch Nr.	Herzgewicht mg	Zuckerverbrauch pro Std. und g Herzgewicht mg	Versuch Nr.	Herzgewicht mg	Zuckerverbrauch pro Std. und g Herzgewicht mg
6	10,97	0,82	4	6,11	4,99
4	9,68	0,50	5	5,94	7,05
7	9,78	0,96	3	5,63	4,64
9	9,65	1,26	2	5,40	5,37
5	8,40	0,52	7	5,39	3,88
1	6,88	0,83	8	5,15	9,50
8	6,50	1,11	1	4,62	6,93
13	4,19	1,02	9	4,12	14,98
20	3,50	4,12	10	3,70	14,38
12	3,20	2,28	6	3,56	10,20
21	2,55	1,88			
10	2,40	1,39			
11	2,05	4,26			

ausgeführten Versuchen hervor; wird allerdings von *Gayda* betreffs seiner Versuche anders gedeutet. Da er durch seine Herzen stets dasselbe Gewicht von 6 g heben ließ, daher die kleineren Herzen eine verhältnismäßig größere Arbeit leisteten, glaubte er schließen zu müssen, daß der verhältnismäßig größere Zuckerverbrauch der kleinen Herzen von ihrer verhältnismäßig größeren Arbeitsleistung herrührt.

Diese Feststellung ist von praktischer Wichtigkeit, weil durch sie bewiesen ist, daß *man vergleichende Bestimmungen des Zuckerverbrauchs*, wenn z. B. die Einwirkung gewisser Eingriffe geprüft werden soll, *nicht an Herzen verschieden großer Tiere derselben* (geschweige denn an Tieren verschiedener) *Art* ausführen darf.

Noch wichtiger ist aber die theoretische Bedeutung obiger Feststellung, weil aus ihr hervorgeht, daß bezüglich des Zuckerverbrauchs eine ähnliche Gesetzmäßigkeit *wie bezüglich des Energieumsatzes besteht.* Während sich aber der verhältnismäßig größere Energieumsatz kleinerer Tiere nach den meisten Autoren und vor allem nach *Rubner* zwanglos aus ihrer verhältnismäßig größeren Körperoberfläche erklären läßt, kann ein ähnlicher unmittelbarer Zusammenhang des Zuckerverbrauchs des überlebenden, vom Tierkörper isolierten Herzen mit der Körperoberfläche aus dem Grunde nicht angenommen werden, als das Herz gar keine aktuelle Bewandtnis mehr mit dem Körper bzw. mit dessen Oberfläche hat. Wenn aber trotzdem aus meinen Befunden sich der erwähnte Zusammenhang ergibt, so läßt sich dies wie folgt erklären.

Da das kleinere Säugetier infolge seiner größeren Körperoberfläche verhältnismäßig mehr Wärme an die Umgebung verliert, muß es, um seine Körpertemperatur auf der für diese Tiere charakteristischen Höhe zu erhalten, verhältnismäßig mehr Stoff bzw. Energie umsetzen;

an diesem erhöhten Umsatze sind aber wohl alle wichtigen Organsysteme, Organe oder Gewebe, darunter auch das Herz beteiligt. Wird, wie dies üblich ist, die Beteiligung des Herzens zu etwa 5% angenommen, und ist das Herzgewicht angenähert proportional dem Körpergewicht, wie dies aus der Tabelle VI auf S. 461 in der Tat hervorgeht, so entfallen z. B. von dem etwa 35 kg/Cal (pro 24 Stunden und 1 kg Körpergewicht) betragenden Umsatz eines 30 kg schweren Hundes *2,75* kg/Cal, von dem etwa 86 kg/Cal (pro 24 Stunden und 1 kg Körpergewicht) betragenden Umsatz eines 3 kg schweren Hundes aber *4,3* kg/Cal auf das Herz.

Daß dem in der Tat so ist, geht aus der Tabelle V hervor, in der ich den Zuckerverbrauch nicht auf 1 g Herzgewicht, sondern auf 1 kg Körpergewicht reduziert und die Versuche nach ansteigendem Körpergewicht geordnet habe. Von einigen aus der Reihe springenden Werten abgesehen, läßt sich so viel sicher sagen, daß innerhalb einer Tierart die höheren Zuckerverbrauchswerte zu den leichteren, die kleineren zu den schwereren Tieren gehören.

Tabelle V.

Zuckerverbrauch pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht in Milligrammen.

Körpergewicht g	Ratte mg	Meerschweinchen mg	Kaninchen mg	Katze mg	Hund mg
196	132				
244	103				
601		46,6			
630		33,3			
641		34,3			
681		33,8			
1500				53,9	
1790			38,0		
1830			44,8		
1860			39,8		
1880				49,5	
1950				34,0	
2360			25,4		
3080				35,4	
3100				28,4	
3360				30,0	
3400				40,0	
3740				30,2	
3930				34,9	
4320					44,2
4970					
5030				25,5	
5050					33,3
7350					27,8

Daß sich aber bei der Reduktion auf die Einheit des Herzgewichts im großen und ganzen dasselbe ergibt, wie bei der Reduktion auf die Einheit des Körpergewichts, ist einfach dadurch verursacht, daß *innerhalb einer Tierart das Verhältnis zwischen Herz und Körpergewicht angenähert dasselbe ist* (siehe weiter unten).

Wenn wir nun finden, daß der Zuckerverbrauch des überlebenden Herzens dieselbe Abhängigkeit vom Körper- bzw. Herzgewicht aufweist (und eine Analogie zwischen den Gesamtleistungen des Herzens und seinem Zuckerverbrauch angenommen werden darf, worüber Näheres weiter unten zu ersehen ist), so muß gefolgert werden, daß zwar die Funktionen des überlebenden Herzens selbstredend nicht durch extrakardinale, im übrigen Tierkörper gelegene Momente beherrscht werden können und die Ursachen dieser Funktionen im Herzen selbst gelegen sein müssen, *immerhin aber das aus dem Körperverbande losgelöste und im Apparat überlebende Herz doch so funktioniert, wie wenn es noch im Dienste des ganzen Körpers stünde.* Ob dies durch seine anatomische oder chemische Veranlagung veranlaßt wird, oder weil es dem Herzen von der Zeit her, da es im lebenden Tiere schlug, angelernt ist, läßt sich zunächst allerdings nicht unterscheiden.

Gegen obige Deutung meiner Versuchsergebnisse könnte eingewendet werden, daß vom kleineren Herzen aus dem Grunde verhältnismäßig mehr Zucker verbraucht wird, weil ich in den Versuchen mit Herzen von derselben Tierart stets, ob es ein kleineres oder ein größeres Herz war, dieselbe Flüssigkeitsmenge in den Apparat eingebracht habe, daher ein kleineres Herz besser mit Zucker und Sauerstoff als das größere versorgt war. Dieser Einwand ist aber aus dem Grunde nicht stichhaltig, weil ja die Menge der in der Zeiteinheit durch die Herzgefäße strömenden Flüssigkeit einzig und allein durch deren Durchlässigkeit (ihrem Kontraktionszustande) bestimmt wird und, sofern die Flüssigkeitsmenge genügend ist, die Versorgung des Herzens von der in den Apparat eingebrachten Flüssigkeit durchaus nicht abhängt.

An Herzen verschiedener Tierarten. Ist der auf die Gewichtseinheit reduzierte Zuckerverbrauch eines kleineren Herzens größer als der eines von derselben Tierart herrührenden größeren Herzens, was mit der verhältnismäßig größeren Körperoberfläche der kleineren Tiere in Zusammenhang gebracht wurde, so ließ sich mit Recht erwarten, daß dieselbe Gesetzmäßigkeit auch für Herzen gilt, die verschieden groß sind, weil sie von verschieden großen Tierarten herrühren. Wir wollen nun sehen, ob dies auch richtig der Fall ist? Ordnet man die an den Herzen verschiedenen Ursprungs erhaltenen Daten ebenso, wie dies im vorangehenden Absatz geschah, nach aufsteigendem Gewicht der Herzen, so steigen die Herzgewichte (Tabelle III) in folgender

Reihenfolge an: Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze, Hund; die für den Zuckerverbrauch berechneten Mittelwerte aber (immer unter Berücksichtigung bloß der ersten Periode) in folgender Reihenfolge: Hund, Katze, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratte. Es besteht also die Tatsache, daß an Herzen verschiedener Tierarten — vom Meerschweinchen abgesehen — der auf die Einheit des Körpergewichts reduzierte *Zuckerverbrauch um so größer ausfällt, je kleiner das Herz ist*, es daher zunächst den Anschein haben könnte, daß der mehr erwähnte Zusammenhang zwischen Zuckerverbrauch und Körperoberfläche auch bezüglich der Herzen verschiedener Tierarten zu Recht besteht.

Betrachtet man hingegen die Werte, die sich ergeben, wenn man den stündlichen Zuckerverbrauch der überlebenden Herzen nicht auf die Einheit des Herzgewichts, wie in Tabelle III, sondern wie in Tabelle V auf die des Körpergewichts bezieht, und ordnet man die Versuche nach ansteigendem Körpergewicht, so ergibt sich, daß *der Zuckerverbrauch der Herzen*, soweit sie von verschiedenen Tieren herrühren, *dem Körpergewicht proportional ist*. Denn nur so ist es möglich, daß, wie aus nachstehender Zusammenstellung ersichtlich, bei so verschiedenen Körpergewichten, 601 bis 671 g an Meerschweinchen, 1790 bis 2360 g an Kaninchen, 1500 bis 5030 g an Katzen und 4320 bis 7350 g an Hunden, die auf 1 kg Körpergewicht reduzierten Maximal-, Minimal-, daher selbstredend auch die Zwischenwerte des Zuckerverbrauchs angenähert gleich sind.

An Meerschweinchenherzen . . .	**46,6**	34,3	33,8	**33,3**	
„ Kaninchenherzen	**44,8**	39,8	38,0	**25,4**	
„ Katzenherzen	**53,9**	49,5	40,0	35,4	34,0
	30,2	30,0	30,0	28,4	**25,5**
„ Hundeherzen	**44,2**	33,8	**27,8**		

Versuch 71 mußte bei dieser Zusammenstellung infolge des auffallend niedrigen Wertes der ersten Periode unberücksichtigt bleiben; denn sicherlich war dieser Wert mit einem Fehler (sei es infolge des Herzzustandes, sei es infolge eines Analysenfehlers) behaftet, was klar daraus hervorgeht, daß er von den Werten in den beiden folgenden Perioden weit übertroffen wurde. Dies aber kam in den übrigen Versuchen niemals in dem Grade vor.

Ist aber, wie es oben den Anschein hatte, der Zuckerverbrauch eine Funktion der Körperoberfläche, so kann sie nicht auch gleichzeitig die des Körpergewichts sein.

Sucht man diesen scheinbaren Widerspruch zu klären, so fällt auch dies nicht schwer. In der Tabelle VI habe ich das Gewicht der Herzen aus ihrem Trockensubstanzgehalt in der wohl richtigen Annahme berechnet, daß der Trockensubstanzgehalt der Herzen normalerweise 20% beträgt. (Von Rattenherzen, da deren bloß zwei vorliegen, habe ich abgesehen.)

Tabelle VI.

Herzgewicht in Prozenten des Körpergewichts.

	Meerschweinchen	Kaninchen	Katzen	Hunde
	0,22	0,12	0,30	0,61
	0,20	0,16	0,28	0,58
	0,21	0,19	0,29	0,71
	0,24	0,16	0,26	0,65
			0,25	
			0,26	
			0,34	
			0,26	
			0,33	
Mittel:	0,22	0,16	0,29	0,64

Während demnach bezüglich der Herzen verschieden großer Tiere *derselben Art* eine Proportionalität zwischen Herz- und Körpergewicht besteht, ist dies bezüglich der Herzen *verschiedener Tierarten* nichts weniger als der Fall. Handelt es sich daher um die Herzen verschiedener Tierarten, so müssen die auf die Einheit des Herzgewichts reduzierten Zuckerverbrauchswerte von diesem Umstande ausschlaggebend beeinflußt sein. Insbesondere müssen, da laut Tabelle VI das Herzgewicht einen um so geringeren Bruchteil des Körpergewichts ausmacht, je kleiner die Tierart ist, von der das Herz herrührt, die *reduzierten Werte an kleineren Tieren (Herzen) aus diesem Grunde allein schon größer ausfallen.*

Aus diesem komplizierten Verhalten der Herzgewichte läßt sich auch die bereits erwähnte, aus Tabelle III ersichtliche Tatsache erklären, wonach die auf den reduzierten Zuckerverbrauch des Meerschweinchenherzens bezüglichen Daten aus der Reihe der übrigen springen, da doch vermöge seines kleineren Gewichts vom Meerschweinchenherzen eigentlich ein verhältnismäßig größerer Zuckerverbrauch zu erwarten wäre, als vom Katzenherzen. Daß dies nicht der Fall ist, rührt sicherlich davon her, daß das Herz des Meerschweinchens im Verhältnis zu seinem Körpergewicht um beinahe 50% schwerer ist als das der Katze in derselben Relation. Während an Hund, Katze und Kaninchen die Verhältniszahl zwischen Herz- und Körpergewicht nach Maßgabe des abnehmenden Körpergewichts eine fortlaufende bedeutende Abnahme erfährt, wäre zu erwarten, daß sie am Meerschweinchen kleiner als an der Katze befunden wird. Da jedoch das Gegenteil hiervon der Fall ist, wird es begreiflich, daß der reduzierte Zuckerverbrauch nicht, wie zu erwarten wäre, größer, sondern kleiner ist als an der Katze.

Durch obiges sei natürlich nicht gesagt, daß an Herzen verschiedener Tierarten ein Einfluß der Oberfläche ausgeschlossen wäre. Denn wenn sie an Herzen gleichartiger Tiere besteht, so ist es gar nicht abzusehen, weshalb dies nicht der Fall sei, wenn es sich um Herzen verschiedener Tierarten handelt.

Nur ist die Abhängigkeit des Zuckerverbrauchs der Herzen von der Körpermasse größer als von der Körperoberfläche, wenn es sich um Herzen *verschiedener Tierarten* handelt, daher in diesem Falle *der Zusammenhang des Zuckerverbrauchs mit der Körperoberfläche verdeckt wird.* An den Herzen gleichartiger Tiere ist die Abhängigkeit des Zuckerverbrauchs von der Körperoberfläche größer, als von der Körpermasse, wird daher (wie in Tabellen I und II) ganz manifest.

Welche Vorsicht übrigens geboten ist, wenn man derlei Schlüsse ziehen will, geht aus folgendem hervor. Wenn man z. B. in zwei Kaninchenversuchen findet, daß ein kleineres Herz verhältnismäßig mehr Zucker verbraucht, als ein größeres, so läßt sich, da Herz- und Körpergewicht sich einander parallel ändern, der Unterschied im reduzierten Zuckerverbrauch verschieden großer Herzen als Analogon des Unterschiedes im Energieumsatz der verschieden großen Tierkörper deuten. Will man jedoch z. B. den auf die Herzgewichteinheit reduzierten Zuckerverbrauch eines Kaninchen- und eines Hundeherzens vergleichen. so darf nicht vergessen werden, daß das Herz eines Hundes viermal so schwer ist, als das eines Kaninchens vom selben Körpergewicht, daher dem Hunde zur Vollbringung derselben Leistung ein viermal so großes Organ in seinem Herzen zur Verfügung steht, als dem Kaninchen. (Ob außer den oben erwähnten noch andere, etwa von der Tierart abhängende Elemente in den Zuckerverbrauch hineingreifen können, mag hier unerwähnt bleiben.)

5. Beziehungen zwischen dem Zuckerverbrauch überlebender Herzen und ihrer Aktion im überlebenden Zustande.

In den vorangehenden Erörterungen wurde der Zuckerverbrauch des Herzens wiederholt mit der von ihm geleisteten Arbeit in Beziehung gebracht, daher es wünschenswert ist, das, was über die Herzaktion in meinen Versuchen zur Beobachtung kam, einer näheren Betrachtung zu unterziehen. Da ich die Bewegungen der Herzen nicht — wie dies von einigen früheren Autoren versucht wurde — registriert hatte, sind es die in den Versuchsprotokollen verzeichneten Daten über Herzfrequenz, sichtbare Größe der Herzkontraktionen allein, die ein wenn auch nur beiläufiges Bild von der Herzaktion geben konnten. Vor allem wollen wir uns aber darüber Rechenschaft ablegen, inwieweit man die Aktion des bei unserer Versuchseinrichtung überlebenden Herzens als physiologisch erachten kann?

Die Verhältnisse, unter denen das Herz in meinen Versuchen arbeitete, sind zwar, soweit sich dies aus den Versuchsergebnissen beurteilen läßt, wesentlich besser, als in den meisten Versuchen früherer Autoren, jedoch von physiologischen jedenfalls weit entfernt. Im leben-

den Tiere ruht das sich kontrahierende Herz seitlich und nach unten auf weich-elastischen Unterlagen (Lungen, Diaphragma) auf; hingegen ragt das überlebende Herz, an der Aorta gleichsam aufgehängt, in den Innenraum der Herzglocke herunter, und man dürfte kaum in der Annahme fehlgehen, daß die sich kontrahierende, oft pendelnde Masse des Herzens heftig an ihren, der Aufhängestelle nahe gelegenen Teilen zerrt. Über den Kontraktionszustand der Coronarien und der aus ihnen abgehenden kleineren Arterien im lebenden Tiere liegen keine direkte Beobachtungen vor; man hat aber Grund, anzunehmen, daß ihr Lumen in feinster Weise derart reguliert wird, daß unter normalen Umständen und bei Körperruhe keine wesentlichen Schwankungen in der Menge des durch den Herzmuskel strömenden Blutes vorkommen. Anders am überlebenden Herzen! Wie aus den in die Generaltabelle eingetragenen Daten hervorgeht, wechselt die Menge der in der Zeiteinheit durch den Muskel strömenden Speiseflüssigkeit auch innerhalb eines Versuchs in sehr bedeutendem Grade, was, wie zuerst *Rohde*[1]) vermutete, nur durch den wechselnden Kontraktionszustand der Coronarien verursacht sein kann. Von einer ganzen Anzahl von größeren Herzen wurde, wie es in der Generaltabelle verzeichnet steht, die Speiseflüssigkeit während der ersten Periode im Strahle ausgeworfen, während sie in den nächsten Perioden tropfenweise gezählt werden konnte. In späteren Versuchen wurde die Menge der in der Zeiteinheit durch die Herzgefäße strömenden Flüssigkeit an einer an der Vorderfläche des Flüssigkeitsbehälters aufgeätzten Teilung abgelesen; ihre Abnahme ist den in Kubikzentimetern angegebenen Daten der Generaltabelle zu entnehmen.

Dieser in der großen Mehrzahl aller meiner Versuche zu konstatierende Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit der Speiseflüssigkeit muß es zum großen Teile, wenn nicht ganz, zugeschrieben werden, daß der Zuckerverbrauch der Herzen in den meisten Versuchen von Periode zu Periode abnahm. Keinesfalls dürfte dies, wie ich meine, davon herrühren, daß mit verringerter Strömungsgeschwindigkeit die dem Herzen gebotene Zuckermenge ungenügend gewesen wäre; denn nur an ganz großen Hundeherzen kam es vor, daß die Zuckerkonzentration am Ende einer Periode von den anfänglichen 0,20% unter 0,10% gesunken wäre, letztere aber noch durchaus physiologische Bedingungen für das Herz bedeutet. Weit eher glaube ich, mit *Rohde*[1]) annehmen zu dürfen, daß bei verringerter Strömungsgeschwindigkeit die Sauerstoffversorgung der Herzen keine genügende war. Es ist ja zu bedenken, daß dem im lebenden Tiere von Blut durchströmten Herzen in 1 ccm des Blutes etwa 0.2 ccm Sauerstoff geboten werden, dem überlebenden Herzen aber in 1 ccm der bei einem Überdruck von 110 mm Hg mit

---

[1]) l. c.

Sauerstoff gesättigten Tyrodelösung, dem Absorptionskoeffizienten entsprechend, etwa 0,02 ccm, also bloß der zehnte Teil. Diese sehr geringe Sauerstoffkonzentration mag bei der größeren Strömungsgeschwindigkeit der ersten Periode noch gerade genügen; weniger, wenn jene Geschwindigkeit nachläßt.

Ähnliches gilt auch für die *Herzfrequenz* und die sichtbare Stärke der Herzkontraktionen. Im lebenden gesunden Tiere kommen diesbezüglich in Abhängigkeit von der Körperlage, Ruhe oder Bewegung, fehlender oder stattgehabter Nahrungsaufnahme usw. gewisse, als physiologisch zu bezeichnende Schwankungen vor. Am überlebenden Herzen sind sie aber weit bedeutender. Ob mit der Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit der Speiseflüssigkeit im Zusammenhang, ob hiervon unabhängig, zeigten sich erhebliche Unterschiede, je nachdem es sich um die erste oder um eine nächste Periode des Versuchs gehandelt hatte, wie dies aus den in der Generaltabelle verzeichneten Daten zu ersehen ist, und es gab auch Perioden, in denen das Herz nur mehr sehr schwach oder anscheinend gar nicht mehr pulsierte, ohne daß der Zuckerverbrauch auch nur im entferntesten in dem erwarteten Maße abgenommen hätte.

Eine etwaige Anreicherung von Ermüdungsstoffen oder, genauer gesagt, eine Zunahme der H-Ionenkonzentration infolge der Bildung von Säuren dürfte an dem von Periode zu Periode abnehmenden Zuckerverbrauch der Herzen keine Schuld haben, da ja die Flüssigkeit am Ende jeder Periode gewechselt wurde. Aber hiervon auch abgesehen, war an kleineren Herzen, wie an den meisten Kaninchenherzen, entweder keinerlei Änderung der H-Ionenkonzentration oder aber eine minimale Abnahme zu beobachten, und nur an den ganz großen von Hunden herrührenden Herzen fand eine ausgesprochene Säuerung statt siehe p_H in der Generaltabelle).

Nach allem dem ist es also durchaus gerechtfertigt gewesen, bei der zahlenmäßigen Bewertung des Zuckerverbrauchs der überlebenden Katzen- und anderen Herzen *stets nur die in der ersten Periode erhaltenen Werte zu berücksichtigen*, da ja die Herzen in dieser Periode dem physiologischem Zustande nach am nächsten waren.

Es ergibt sich aber aus obigen Betrachtungen ein Umstand, der nicht unerwähnt bleiben darf, wenn man den Zuckerverbrauch des Herzens mit seinen anderen Leistungen in Verbindung bringen will. Mit sinkender Durchströmung, mit abnehmender Frequenz und Kontraktionsstärke nahm der Zuckerverbrauch wohl in den meisten Versuchen ab, doch lange nicht in diesem Maße, wie zu erwarten gewesen wäre. So gab es einzelne Perioden, in denen das Herz nur mehr sehr schwach oder anscheinend gar nicht pulsierte, ohne daß

der Zuckerverbrauch auch nur im entferntesten entsprechend abgenommen hätte.

Diese meine Befunde sind nicht neu, da bereits *Locke* und *Rosenheim*[1]) durch Entziehung der Ca- bzw. Ca- und H-Ionen Stillstand der überlebenden Herzen, bei weiter fortdauerndem Zuckerverbrauch herbeiführen konnten; *Loewy* und *Weselko*[1]) fanden gar, daß Herzen, mit einer mit N gesättigten Speiseflüssigkeit durchströmt, kaum mehr schlagen, jedoch mehr Zucker verbrauchen, als bei Verwendung einer mit Sauerstoff gesättigten Lösung; ferner *Underhill* und *Prince*[1]) keinen Unterschied im Zuckerverbrauch schlagender und stillstehender fanden; endlich *Verzár* und *Vásárhelyi*[1]) zuweilen ansehnlichen Zuckerverbrauch an Herzen finden konnten, die sich kaum ein- bis zweimal pro Minute kontrahierten, hingegen oft einen weit geringeren Zuckerverbrauch an Herzen mit guter Frequenz.

Daß aber im Falle eines Herzstillstandes der Zuckerverbrauch nicht immer fortdauert, geht aus dem folgenden, von mir zufällig erhobenen Befunde hervor. Um das lästige Schäumen der von Sauerstoff durchperlten und durch das Pumpwerk gehobene Speiseflüssigkeit zu verhüten, habe ich sie in einem Versuch mit ein wenig Octylalkohol versetzt, worauf in kürzester Zeit das Herz stillstand. Auf Grund der auch oben erörterten Erfahrung, daß Zucker auch bei stillstehendem Herzen verbraucht werden kann, habe ich den Versuch nicht abgebrochen, sondern die Flüssigkeit noch einige Stunden lang zirkulieren lassen und ihre Zuckerkonzentration bestimmt. Diese betrug

an der frisch bereiteten unverwendeten Lösung . . . 0,122%
nach einstündiger Zirkulation durch das Herz 0,119%
nach fünfstündiger Zirkulation durch das Herz . . . 0,115%

Es hatte also ein Zuckerverbrauch überhaupt nicht oder nur in minimalem Grade stattgefunden.

Es ist hier nicht am Platze, auf die hochwichtigen Beziehungen zwischen Muskelaktion und Kohlehydratumsatz einzugehen, die zurzeit im Mittelpunkt des biophysikalischen und biochemischen Interesses stehen. An dieser Stelle soll nur wiederholt und nachdrücklich auf die Schwierigkeit der Bewertung der an überlebenden Herzen erhaltenen Ergebnisse verwiesen werden. Denn einerseits müssen sie bezüglich der Versuchstechnik der strengsten Kritik standhalten, andererseits darf sicherlich angenommen werden, daß die Unstimmigkeit zwischen Zuckerverbrauch und sichtbarer mechanischer Leistung, die sich in derlei Versuchen offenbart, an den im Tierkörper normal funktionierenden Herzen *nicht* besteht.

[1]) l. c.

Generaltabelle.

Nr.	Datum	Geschlecht	Körpergewicht g	Herzgewicht feucht g	Herzgewicht trocken g	der stündliche Zuckerverbrauch mg	die Temperatur der in d. Kanüle eintretenden Speiseflüssigkeit °C	die Strömungsgeschwindigkeit der Speiseflüssigkeit ccm oder Tropfen pro Minute	die Herzfrequenz pro Minute	die sichtbare Stärke der Herzkontraktion	p_H	Bemerkungen
						Ratten.						
53	16. VIII. 1926	♂	196	0,7	0,085	25	38,2	30 ccm	171	gut	7,82–7,92	
						24	38,1	43 „	160	„	—	
						21	38,5	14 „	128	„	—	
54	12. VIII.	♂	244	1,1	0,167	25	38,5	30 „	nicht zählbar	„	7,84–7,94	
						26	38,5	27 „		„	—	
						27	38,5	27 „	—	keine	—	
						Meerschweinchen.						
55	24. VIII. 1926	♂	630	2,0	0,279	21	38,3	50 ccm	160	gut		
						24	38,4	60 „	160	„		
						20	38,2	60 „	128	„		
56	19. VIII.	♂	681	2,2	0,270	23	38,6	24 „	160	„	7,80–7,94	
						22	38,3	17 „	136	„	—	
57	21. VIII.	♂	641	2,3	0,265	22	38,0	7 „	schwach	schwach	7,70–8,00	
						12	37,0	2,5 „	—	0	—	
						13	37,2	2,5 „	—	0		
58	23. IX.	♂	601	2,7	0,291	28	38,6	16 „	170	gut	7,82–8,06	
						29	38,2	20 „	170	„	—	
						19	38,5	15 „	162	„	—	
						Kaninchen.						
59	9. X. 1926	♂	1790	3,1	0,466	68	38,0	8 ccm	93	gut	7,76–7,76	
						52	36,6	3 „	91	„	7,76–7,74	
						72	37,0	2,5 „	88	„		
60	7. X.	♀	1860	4,9	0,597	74	37,9	45 „	152	„	7,68–7,66	
						68	38,2	30 „	152	„	—	
61	15. VII.	♀	1830	6,7	0,685	82	38,8	15 „	99	„	8,00–7,77	
						62	38,4	9 „	71	„	—	
						62	37,5	5 „	64	„	—	
62	24. VII.	♂	2860	7,5	0,780	60	38,8	16 „	119	„	7,74 7,72	
						64	38,4	4 „	97	„		
						[illegible]	[illegible]	[illegible] „	[illegible]	„	—	

63	11. V. 1926	♀	1500	8,5	0,905	81	38,5	Strahl	183	gut		
						79	38,5	„	164	„		
						73	38,2	108 Tropfen	126	schwach		
64	14. V.	♀	1880	10,3	1,057	93	38,0	Strahl — 36 Tr.	151	gut		
						57	35,1	20 Tropfen	91	gut, spärlich		
						66	33,8	20 „	60	„ „		
50	27. IV.	♀	1950	10,5	1,128	67	38,5	Strahl	151	schwach		*Ambrus*
						78	37,5	94 Tropfen	80	nur Vorhof		
						65	33,8	31 „	—	0		
46	26. XI. 1925	♀	3250	11,9		7,7	37,3	127 „	127	schwach		„
52	3. V. 1926	♀	3080	13,8	1,588	109	38,5	Strahl	137	gut		„
						85	38,2	97 Tropfen	85	ziemlich gut		
						58	37,3	75 „	—	sehr schwach		
65	7. V.	♀	3100	13,7	1,575	88	38,5	Strahl	203	gut		
						88	37,1	68 Tropfen	117	schwach		
						66	34,0	24 „	—	0		
66	7. VIII.	♂	3360	14,8	1,751	100	38,2	80 ccm	200	gut		
						98	38,0	25 „	138	„		
						97	37,5	10 „	86	schwach		
51	30. IV.	♂	3400	17,7	2,27	136	38,2	Strahl	153	gut		„
						130	38,2	115 Tropfen	128	ziemlich gut		
67	11. VI.	♂	3930	18,7	—	137	38,2	Strahl	142	gut	8,00-7,53	
						102	37,1	36 Tropfen	128	schwach	8,00-7,45	
						102	35,1	20 „	—	sehr schwach	8,00-7,38	
68	27. VI.	♂	3740	20,4	1,970	113	38,3	60 ccm	200—80	gut	7,80-7,70	
						99	38,0	6 „	40	„	—	
69	29. VII.	♂	5030	30,0	3,368	130	37,8	60 „	116	„	7,89-7,51	
						127	38,5	11 „	152	„	—	
						110	37,2	4 „	—	sehr schwach	—	
							Hunde.					
70	14. X. 1926	♀	4320	44,7	5,252	191	37,7	73 ccm	93	schwach		
						170	38,0	37 „	109	„		
						112	38,3	10 „	—	0		
71	27. IX.	♀	4970	46,6	5,787	96	38,2	470 „	66	gut	7,91-7,66	
						135	37,7	450 „	88	„	—	
						145	37,7	520 „	80	„	—	
72	12. X.	♀	5050	56,3	7,137	168	37,5	180 „	91	schwach	7,76-7,41	
						178	37,1	140 „	66	„	7,76-7,21	
						178	37,5	60 „	58	„	7,76-7,21	
73	4. VIII.	♀	7350	77,8	9,564	204	38,0	270 „	108	gut	7,88-5,16	
						214	37,7	160 „	80	„	—	
						186	38,2	30 „	80	„	—	

Endlich darf auch des Umstandes nicht vergessen werden, daß während für einen erwünschten Glykogengehalt des im normalen Tiere schlagenden Herzens sicherlich ein exakt funktionierender Mechanismus regulierend sorgt, der Glykogengehalt der Herzen, sowie sie Tieren entnommen und zum Überlebendversuch verwendet werden, ein sehr verschiedener ist, was vielleicht von ausschlaggebendem Einfluß auf ihren Zuckerverbrauch ist. Allerdings sind die hierüber geäußerten Ansichten verschiedener Autoren durchaus widersprechend. Während z. B. *Klewitz*[1]) fand, daß zahlreiche Herzen, ob glykogenhaltig oder durch vorangehende Phlorrhizinbehandlung des Tieres glykogenfrei gemacht, *keinen* (!) Traubenzucker verbrauchen; ferner *Loewy* und *Weselko*[2]), dann *Mansfeld*[2]), endlich auch *Gayda*[2]) keinen Unterschied im Glykogengehalt der Herzen finden, ob sie den Tieren frisch entnommen oder nach vorangehender Durchströmung im überlebenden Zustande untersucht wurden, betonen *Patterson* und *Starling*[2]), daß man den Kohlehydratumsatz eines Herzens, ohne seinen Glykogengehalt zu kennen, überhaupt nicht bestimmen kann, *Cruickshank* und *Patterson*[2]) aber, daß das Herz zunächst immer sein eigenes Glykogen umsetzt; *Camis*[3]) findet den Glykogenvorrat im Herzen von Pflanzenfressern nach beendetem Durchströmungsversuch unverändert, im Herzen von *Fleischfressern verringert.*

Kurz zusammengefaßt, lauten die Ergebnisse meiner Versuche wie folgt:

1. Der auf 1 Stunde und 1 g feuchten Herzgewichts reduzierte Zuckerverbrauch der Herzen von 2 bis 3 kg schweren Katzen beträgt in Übereinstimmung mit den Ambrusschen Befunden gegen 7 mg, also weit mehr, als von den meisten früheren Autoren gefunden wurde.

2. Auch an Herzen anderer Säugetierarten ist der Zuckerverbrauch weit höher als bisher angegeben wurde.

3. Es ist richtiger, den Zuckerverbrauch der Herzen auf sein Trockengewicht oder noch besser auf den Zustand, in dem sich das Herz im lebenden Tiere befindet (normaler Wassergehalt!), zu beziehen, als, wie bisher üblich, auf sein infolge Durchtränkung mit Wasser vergrößertes Gewicht, wie es am Ende eines Durchströmungsversuchs gefunden wird.

4. An Herzen gleichartiger Tiere ist der Zuckerverbrauch eines Herzens verhältnismäßig um so größer, je kleiner das Herz ist, und umgekehrt: eine Teilerscheinung der bekannten Abhängigkeit zwischen Stoff-(Energie-)umsatz und Körperoberfläche.

---

[1]) *F. Klewitz*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **98. 91, 1923.**
[2]) l. c.
[3]) *M. Camis*, Zeitschr. f. allgem. Physiol. **8, 371, 1908.**

5. An Herzen, die von verschiedenen Tierarten herrühren, ist ein derartiger Zusammenhang nur scheinbar vorhanden, indem es durch das von Tierart zu Tierart verschiedene Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht vorgetäuscht wird.

6. Der Zuckerverbrauch überlebender Säugetierherzen steht in keinem Verhältnis zur sichtbaren Stärke der Herzaktion (Frequenz, Art der Kontraktion).

Die Kosten des Apparates, an dem diese Versuche ausgeführt wurden, ergaben sich aus der Zuwendung der *Ella Sachs-Plotz*-Stiftung, wofür auch an dieser Stelle bester Dank quittiert sei.



Über kapillaraktive Wirkung des Filtrierpapiers.

Von

L. Jendrassik und A. Czike.

(Aus der medizinischen Klinik der Erzsébet-Universität Pécs, Ungarn.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der staatlichen naturwissenschaftlichen Stiftung.)

(Eingegangen am 26. April 1927.)

Im vorigen Jahre hat einer von uns die Beobachtung mitgeteilt, daß Filtrierpapiere, aber auch andere Adsorbenzien, mit wässerigen Lösungen in Berührung gebracht, imstande sind, die statische Oberflächenspannung beträchtlich zu senken (1). Diese Erscheinung tritt bei der Messung der Oberflächenspannung mittels der Ringmethode von *Brinkman* und *van Dam* (2) zutage.

Die Behandlung der Lösung mit Filtrierpapier bestand in diesen Versuchen darin, daß die Oberfläche mit einem Stückchen Papier mehrmals langsam abgestreift, oder ein Stückchen Papier in die Lösung gelegt wurde (2 qcm Filtrierpapier in 2 bis 3 ccm in einem Uhrgläschen befindlicher Flüssigkeit). Die Herabsetzung der Oberflächenspannung erwies sich bei den meisten Lösungen reversibel. Wurde die Oberfläche gestört (durch Umrühren oder Durchfließenlassen an einer Kapillare, z. B. des Stalagmometers), so wurde wieder die ursprüngliche Oberflächenspannung erhalten. (Eine Ausnahme machte hiervon Eucupin-HCl, bei welchem die Restitution nicht vollständig gelang, und die Senkung der Oberflächenspannung auch mit dem Stalagmometer nachzuweisen war.) Auf Grund dieser Erscheinungen wurde mit der Möglichkeit gerechnet, daß nicht die Lösung in toto, sondern in irgend einer Weise die Oberflächenschicht verändert wird. (Jedoch die Meinung, daß es sich hierbei nicht um ein Herausdiffundieren von kapillaraktiven Substanzen aus dem Papier handeln kann, erwies sich allerdings nicht haltbar.) Aus äußeren Gründen mußte damals die Fortsetzung dieses Themas unterbrochen werden. Die weitere Verfolgung der Erscheinungen ergab nun folgendes:

Die Wirkung des Papiers ist sehr davon abhängig, wie es mit der Lösung in Berührung gelangt. Bei den nicht bedingt kapillaraktiven Flüssigkeiten hat nur die Berührung der Oberfläche eine Wirkung. Die Herabsetzung der Oberflächenspannung ist dabei um so stärker, je größer das Stück Papier und je länger es mit der Oberfläche in Be-

rührung war. Die größte Senkung erhält man, wenn man das Stückchen Filtrierpapier (etwa 3 × 3 cm) an den Rand der Flüssigkeit setzt, welche sich in einem Uhrschälchen befindet, und dieses über etwa 5 Minuten dort läßt. In dieser Weise wird auch die Oberflächenspannung des reinen Wassers ebenso erniedrigt wie anderer (nicht bedingt kapillaraktiver oder nicht kapillaraktiver) Lösungen. (Werte auch unterhalb 40 dyn/cm, entsprechend 72,8 mg. Wasserwert des verwendeten Ringes = 133 mg.)

Daß es hierbei tatsächlich auf die Berührung mit der Oberflächenschicht ankommt, wurde auch folgendermaßen erwiesen. Eine Filtrierpapierscheibe wurde an einem Drahtring befestigt, und diese nach Benetzen mit Wasser mit Hilfe einer geeigneten Anordnung unter Chloroform getaucht. Oberhalb der Chloroformschicht befand sich Wasser, dessen Oberflächenspannung mit der Torsionswage gemessen wurde. Nun wurde die Papierscheibe in wagerechter Lage langsam gehoben, bis sie in die wässerige Phase gelang. Hierbei war noch gar keine Abweichung in der Oberflächenspannung bemerkbar. Eine Senkung zeigte sich aber, sobald das Papier die obere Wasseroberfläche erreichte und zum Teil oder ganz über diese ragte.

Die Wirkung der Abstreichung der Oberfläche hängt von der Geschwindigkeit ab, mit welcher das Bewegen des Papiers erfolgt. Geschieht dies langsam, so kann die Berührungszeit eine genügende sein, damit die senkende Wirkung sich ausbildet. Erfolgt das Abstreifen mit einer schnellen Bewegung, so tritt die Senkung in Hintergrund und die Adsorptionsschicht — wenn vorhanden — wird durch den Eingriff gestört. War also die Oberflächenspannung durch eine adsorbierte Substanz ursprünglich tiefer als die des Wassers, so wird durch ein schnelles Abstreifen der Wert gesteigert. So kann man mit demselben Stück Papier die Oberflächenspannung senken und je nach Belieben wieder erhöhen, wenn man die Oberfläche erst langsam, sodann durch schnelle Bewegung abstreift.

Die Erklärung der senkenden Wirkung ist recht einfach. Da man auch die Oberflächenspannung des reinen Wassers durch Papier senken kann, ist es schon im voraus wahrscheinlich, daß irgend eine kapillaraktive Substanz aus dem Papier auf die Oberfläche diffundiert. Die untenstehenden Versuche beweisen, daß dies tatsächlich der Fall ist.

Es war aber zu fragen, welcher Art diese Stoffe sind, und ob man sie aus dem Papier bzw. der Watte isolieren könnte. Es wurden mehrere Sorten Filtrierpapiere der Firma Schleicher & Schüll erprobt. Alle verhielten sich senkend. Der kapillaraktive Stoff muß daher in allen diesen enthalten sein (286, 575, 581, 589, I, II, III, 595, 597, 598, 602, *Bang*sches Löschpapier).

Durch verdünnte Säure und Lauge (n/10 HCl und n/10 NaOH), ebenso durch Wasser ist das Papier auch in der Hitze von seinen kapillaraktiven Verunreinigungen nicht zu berauben (½ Stunde langes Kochen und mehrtägiges Stehenlassen der Papiere in der Flüssigkeit, sodann Auswaschen in reinem Wasser und Trocknen bei 37°). Die Papiere waren auch nach dieser Behandlung wirksam, nur durch NaOH zeigte sich eine gewisse, jedoch nicht konstante Abnahme der kapillaraktiven Wirkung. Daß Cellulose selber kapillaraktive Wirkung entfalten könnte, ist schon an und für sich nicht wahrscheinlich. Hiergegen spricht aber in gewissem Grade, daß auch die Oberflächenspannung einer Lösung von Kupferoxydammoniak, also ein Lösungsmittel der Cellulose, ebenso deutlich gesenkt wird, wie die des Wassers. Wir haben auch einige Umwandlungsprodukte der Cellulose auf ihre Kapillaraktivität geprüft, da die Möglichkeit bestand, daß vielleicht diese, in kleinen Mengen im Papier vorhanden, die Wirkung hervorrufen könnten. Hydrocellulose, α-, β- und γ-Cellulose, die wir aus Filtrierpapier bzw. aus reiner Watte bereitet haben (3), erwiesen sich kapillarinaktiv bzw. nicht stärker aktiv als Filtrierpapier selber. Kieselsäure, Stärke sind nicht kapillaraktiv, können zur Erklärung schon hierdurch nicht in Rede kommen. Das stärkefreie Papier Nr. 581 wirkt auch ebenso wie die übrigen Sorten.

Die kapillaraktive Substanz ist aber *mit Alkohol gut extrahierbar*. Papiere mit entsprechenden Mengen Äthylalkohol (96 bis 97%) genügende Zeit behandelt (z. B. 40 qcm Papier Nr. 581 während 3 Tagen mit 50 + 50 ccm Alkohol extrahiert), verlieren ihre oberflächenspannungssenkende Wirksamkeit vollständig. Dampft man den so erhaltenen Extrakt ein, so bleibt eine gelblichbraune, fettartige Masse zurück, welche sich außerordentlich kapillaraktiv verhält. Gibt man ein ganz kleines Klümpchen davon an den Rand einiger Kubikzentimeter Wasser in einem Uhrgläschen, so sinkt die statische Oberflächenspannung sofort auf extrem niedrige Werte (35 bis 38 dyn/cm). Wässerige Lösungen des Alkoholextrakts, ebenso wässerige Papierextrakte verhalten sich bei der stalagmometrischen Messung trotzdem völlig kapillarinaktiv. Eine Senkung der Oberflächenspannung ist nur mit der empfindlicheren Ringmethode nachweisbar.

Äther und Chloroform befreien das Papier unter analoger Behandlung nicht ganz von seinen kapillaraktiven Bestandteilen, die Wirksamkeit des Papiers wird jedoch deutlich geschwächt. Im Rückstand des verdampften Lösungsmittels kann man die kapillaraktive Substanz sicher nachweisen. Noch schwächer als Äther und Chloroform extrahiert Aceton.

Aus alledem ist es gesichert anzunehmen, daß die Wirkung durch eine kapillaraktive Substanz (bzw. Substanzen) zustande kommt, welche sich aus dem Papier auf die Oberfläche des Wassers in einer Schicht ausbreitet. Daß hierbei ein kapillaraktiver Stoff das Adsorbens verläßt, ist an sich nicht verwunderlich, da die Flüssigkeitsoberfläche eine relativ leere Adsorptionsfläche darstellt, welche erst mit der Substanz entsprechend beladen werden muß, bis sich das Gleichgewicht

zwischen den Adsorptionsflächen des Papiers und der Flüssigkeit einstellt.

Mit der Frage, welche Verbindungen in diesen Extrakten die eigentlichen Träger der kapillaraktiven Eigenschaften sind, wollen wir uns nicht weiter befassen. Für uns war die Erscheinung nur vom methodischen Standpunkte aus von Belang. Es scheint aber, daß für andere Forschungsgebiete diese Substanzen nicht ohne Interesse sind. Eben durch die Freundlichkeit der Firma *Schleicher* & *Schüll* wurden wir auf die Arbeiten von *Fitting* (Bonn) aufmerksam gemacht, der durch Extrakte aus Filtrierpapier an Pflanzenzellen auffallende Plasmaströmungen hervorrufen konnte. Von botanischem Standpunkte aus hat diese Erscheinung eine Wichtigkeit, da — nach *Fitting* — diese Substanzen wahrscheinlich auch in den lebenden Pflanzenteilen vorhanden sind, aus welchen die untersuchten Papiersorten dargestellt werden.

Anders steht es mit den sogenannten bedingt kapillaraktiven Lösungen, in welchen eine Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration eine Änderung der Oberflächenspannung hervorruft. Da Filtrierpapier als ein Adsorbens mit negativer Ladung bekanntlich Säuren bindet, das p_H steigert, so ist es imstande, die Oberflächenspannung derartiger Lösungen, z. B. von Alkaloidsalzen auf diese Weise zu erniedrigen. Im Falle von Alkaloidsalzlösungen setzt sich daher die senkende Wirkung des Filtrierpapiers aus zwei Komponenten zusammen:

1. Es besteht auch hier der Einfluß der herausdiffundierenden kapillaraktiven Substanz. Dieser Teil der Senkung ist durch Störung der Oberfläche rückgängig zu machen.

2. Hierzu gesellt sich die Steigerung der Kapillaraktivität durch Erhöhung des p_H. Wird ein Teil der Säure gebunden, so vermehrt sich bekanntlich die hydrolytisch freigespaltene Alkaloidbase, welche der eigentliche Träger der kapillaraktiven Eigenschaften ist. Dieser Einfluß erstreckt sich auf die ganze Lösung, ist durch Störung der Oberfläche nicht reversibel und ist auch mit stalagmometrischer Messung nachweisbar. Bringt man die Lösung eines Alkaloidsalzes (Eucupin - HCl, Novocain - HCl) mit Filtrierpapier in Berührung, so ist die stattgefundene Senkung der statischen Oberflächenspannung durch Erfrischung der Oberfläche daher nur zum Teil reversibel.

Zur genauen Ausführung dieser Versuche muß man die Oberfläche der Flüssigkeit vor der ersten Messung, also vor der Behandlung mit Papier, durch ein- bis zweimaliges schnelles Abstreifen reinigen. Dies ist nötig, weil sonst in verdünnteren Lösungen schon zu Beginn die Oberflächenspannung durch Anwesenheit einer Absorptionsschicht erniedrigt sein kann. Bei der Erfrischung der Oberfläche nach der Papierwirkung könnte dann durch die Zerstörung dieser Schicht die Spannung auch über die anfänglich gemessene steigen.



Daß die irreversible Komponente der Senkung tatsächlich durch die *h*-Änderung zustande kommt, ist auch daraus ersichtlich, daß dieser Einfluß in gut *gepufferten Lösungen* ausbleibt. Behandelt man eine pufferhaltige Alkaloidlösung mit Papier, so ergeben nur die herausdiffundierten kapillaraktiven Stoffe eine Senkung. Nach Abstreifen der Oberfläche wird wieder der ursprüngliche Wert gemessen.

Beeinflußt das Filtrierpapier so stark die Oberflächenspannung, so bleibt noch zu fragen, ob nicht durch ein vorangehendes Filtrieren die gemessenen Werte entstellt werden. Unsere Versuche zeigten, daß die erstere Komponente, also die kapillaraktiven Verunreinigungen des Papiers hierfür ohne Bedeutung sind. Dies ist wohl zu verstehen, da in filtrierter Flüssigkeit sich immer eine neue Oberfläche ausbildet. Nicht bedingt kapillaraktive Lösungen werden daher nicht beeinflußt. Die zweite Komponente ist aber wohl nachweisbar: die Oberflächenspannung von Alkaloidsalzlösungen wird durch ein Filtrieren erniedrigt.

Untenstehend seien einige Beispiele unserer Messungen angeführt.

1. 5% Novocain-HCl. $p_H = 6{,}3$[1]).

10 ccm der Lösung in Jenaer Kochglas + 8 Stück je 7 qcm Filtrierpapier Nr. 581, für 7 Minuten. p_H nachher = 6,7.

2. 2,5 ccm 5% Novocain-HCl im Uhrglas.

2 Minuten	=	Oberflächenspannung = 131,0 mg.
5 „	=	130,5 mg.
7 „	=	7 qcm Filtrierpapier Nr. 581 hineingelegt.
13 „	=	105,6 mg.
20 „	=	103,8 mg (Filtrierpapier herausgenommen). Die Oberfläche zweimal abgestreift:
28 „	=	121,5 mg, einmal abgestreift:
30 „	=	120,5 mg.

3. Je 2,5 ccm 5% Novocain-HCl, 3 Minuten nach dem Ausgießen gemessen.
Nicht filtriert 131,5 mg. Filtriert (Nr. 581) = 124,5 mg.

4. 0,02‰ Eucupin-HCl. $p_H = 5{,}7$.

Zu 10 ccm der Lösung in Jenaer Kochglas + 8 Stück je 7 qcm Filtrierpapier Nr. 581, für 7 Minuten. p_H nachher = 6,3.

5. 2,5 ccm 0,02‰ Eucupin-HCl.

2 Minuten	=	(nach einmaligem Abstreifen) 124,5 mg.
3 „	=	5 qcm Filtrierpapier Nr. 581 in die Lösung.
5 „	=	105,5 mg.
6 „	=	(einmal abgestreift) 117,5 mg.
7 „	=	(„ „) 115,5 „ Die Oberflächenspannung steigt nicht zurück.

[1]) Messung mit den einfarbigen Indikatoren von *Michaelis* und *Gyémánt*. Die Eichung der Kontrollröhrchen geschah mit Hilfe von *Sörensen*schen Puffermischungen.



6. 2,5 ccm 0,1 ‰ Eucupin-HCl.

12 Uhr	53 Minuten	=	117,0 mg.
1 „	10 „	=	(einmal abgestreift) 118,0 mg.
1 „	12 „	=	14 qcm Filtrierpapier Nr. 581 in die Lösung gegeben.
4 „	49 „	=	93,0 mg.
4 „	50 „	=	Filtrierpapier herausgenommen, Oberfläche abgestreift.
4 „	53 „	=	109,5 mg.
4 „	56 „	=	(zweimal abgestreift) 111,0 mg.
4 „	58 „	=	(dreimal „) 109,5 „ Die Oberflächenspannung steigt nicht zurück.

7. 0,1 ‰ Eucupin-HCl.

p_H = 3,9. Tropfenzahl = 36,8 (Wasser 33,5). Torsionswage = 126,5 mg. Nach einmaligem Abstreifen = 128,5 mg. In 16 ccm Lösung 16 Stück 14 qcm Filtrierpapier Nr. 581, für 7 Minuten. p_H = 4,4. Tropfenzahl = 37,9. Torsionswage = 103,5 mg, einmal abgestreift = 108,0 mg.

8. 1 ‰ Eucupin-HCl 1 : 10 mit mol. KH_2PO_4 verdünnt
= 3 ccm 0,1 ‰ Eucupin-HCl. p_H = 4,3.

11 Uhr	45 Minuten	=	(Oberfläche zweimal abgestreift) 112,0 mg.
11 „	46 „	=	(„ einmal „) 113,0 „
11 „	48 „	=	14 qcm Filtrierpapier Nr. 581 in die Lösung.
3 „	32 „	=	105 mg.
3 „	33 „	=	(Filtrierpapier herausgenommen, einmal abgestreift) 113,0 mg. (Zurückgegangen.)

9. 1 ‰ Eucupin-HCl 1 : 10 mit Citratgemisch verdünnt (5 % Citronensäure und 5 % Na-Citrat, 3 : 7) = 0,1 ‰ Eucupin-HCl. p_H = 4,6.

0	Minuten	=	(einmal abgestreift) 104 mg.
2	„	=	14 qcm Filtrierpapier Nr. 581 in die Lösung.
8	„	=	88,0 mg.
9	„	=	(einmal abgestreift) 104,5 mg.

Die Wirkung von anderen Adsorbenzien ist bei den nicht bedingt kapillaraktiven Lösungen recht ungleich und nicht gut reproduzierbar. Wo sich eine Erniedrigung ergibt, erfolgt dies wahrscheinlich auch auf Kosten kapillaraktiver Verunreinigungen, welche die Oberfläche des Pulvers in irgend einer Weise aufgenommen hatte. Bei bedingt kapillaraktiven Lösungen kann die Säurebindung eine beträchtliche Wirkung haben.

Zusammenfassung.

Bei schnellem Abstreifen der Oberfläche einer wässerigen Lösung mit einem Stück Filtrierpapier besteht die Wirkung in einer Zerstörung der Adsorptionsschicht, wodurch die Oberflächenspannung meistens erhöht wird.

Bleibt das Papier eine Weile mit der Lösung in Berührung, so erfolgt eine Senkung, und zwar auf zweierlei Wegen:

1. Die Filtrierpapiere enthalten kapillaraktive Verunreinigungen, welche sich an der berührten Oberfläche ausbreiten. Diese Stoffe sind mit Alkohol gut extrahierbar.

2. Bei bedingt kapillaraktiven Lösungen, wie die Alkaloidsalze, wird durch Säurebindung das p_H gesteigert und die Oberflächenspannung auf diese Weise gesenkt.

Literatur.

1) *L. Jendrassik*, diese Zeitschr. **169**, 178, 1926. — 2) *R. Brinkman* und *E. van Dam*, Münch. med. Wochenschr. **68**, 1550, 1921; siehe auch *T. Tominaga*, diese Zeitschr. **140**, 230; **141**, 248, 1923. — 3) *G. Zemplén*, Die Kohlehydrate. Abderhaldens biol. Arbeitsmethod. Abt. I, Teil 5.

Über den Abbau von Aminosäuren und Aminopurinen durch Methylglyoxal und verwandte Substanzen.

Von

Carl Neuberg und Maria Kobel.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Wenn wir bei unseren Versuchen[1]) über die Reaktion zwischen einer Aminosäure und einem Zucker, die sich durch die augenblicklich erfolgende Drehungsänderung zu erkennen gibt, das Kohlenhydrat durch Methylglyoxal ersetzen, so finden wir, daß beide Substanzen momentan in eine Beziehung zueinander treten. Es zeigt sich, daß eine sofortige Drehungsbeeinflussung beim rechtsdrehenden Alanin, bei dem linksdrehenden Asparaginat, ferner bei dem linksdrehenden Caseinpepton sowie anderen Proteosen geschieht, und daß sie überall nach rechts orientiert ist. Schon innerhalb kurzer Zeit verringert sich jedoch der Unterschied zwischen dem Drehwert des Komponentengemisches und dem seiner Einzelbestandteile; der Sinn der Drehungsdifferenz wird dabei nach der entgegengesetzten Richtung gekehrt.

Dieses Verhalten, das bei Zimmertemperatur zu konstatieren ist, wies darauf hin, daß eine tiefergreifende Reaktion zwischen den beiden Komponenten statthat, und in dieser Überzeugung wurden wir durch die Tatsache bestärkt, daß die anfangs farblosen Mischungen sich zunehmend gelb bis braunschwarz färben. Da auch diese Melaninbildung bald einsetzt und sich in der Kälte vollzieht, so war sie gleichfalls ein Anzeichen für weitgehende Veränderungen.

Digeriert und destilliert man ein Gemisch von Methylglyoxal und Alanin (0,89 g l (+) Alanin + 0,72 g Methylglyoxal), die in 50 ccm Wasser gelöst waren, so erfolgt unter kräftiger Kohlensäureentwicklung eine Desaminierung und es entweicht Acetaldehyd. Die Umsetzung geschieht sowohl im Wasserstoffstrom wie im Stickstoffstrom als in der Luft, sie ist also unabhängig vom Sauerstoff. Im Verlaufe der Reaktion wird das Methylglyoxal verbraucht. Man erhält leicht aus 0,89 g Alanin

[1]) *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. **162**, 496, 1925; **174**, 464, 1926; **179**, 451, 1926; **182**, 273, 1927.



0,11 g CO_2 und 0,21 g Acetaldehyd, sowie 0,008 g Ammoniak. In einem molekularen Verhältnis scheinen die drei Produkte nicht zu stehen. Es ist aber wahrscheinlich, daß außer den genannten Stoffen andere auftreten und daß insbesondere das primär aus Alanin abgespaltene Ammoniak von den Ingredienzien unter Erzeugung anderer basischer Verbindungen verbraucht wird.

Nimmt man die Reaktion in einer Wasserstoff- oder Stickstoffatmosphäre vor, so kann man die Abgabe von Kohlensäure ohne weiteres in einer vorgelegten Barytwasser-lösung wahrnehmen. Schaltet man zwischen dem Entwicklungskolben und der Barytvorlage mehrere mit Wasser beschickte und stark gekühlte Absorptionsgefäße ein, so sammelt sich hier der Acetaldehyd an. Ammoniak geht nur in geringer Menge über; seine Hauptquantität verbleibt in dem schließlich sauer reagierenden Destillationsrückstande und kann hieraus mit Lauge frei gemacht werden.

Ähnlich dem Alanin verhalten sich dem Methylglyoxal gegenüber auch andere Aminosäuren, z. B. Glykokoll und Phenyl-amino-essigsäure.

Im Prinzip wirkt das Methylglyoxal hier wie Alloxan bei der Reaktion von *Strecker* oder wie Chinon und Isatin bei der Reaktion von *Wilhelm Traube* oder wie die Anthracenderivate bei den photokatalytischen Reaktionen von *Neuberg* und *Galambos*.

Gegenüber dem Effekt dieser sämtlich zyklisch gebauten und körperfremden Substanzen steht der von uns beobachtete Vorgang, der sich bei niederer Temperatur abspielt und durch einen aliphatischen Körper, das Methylglyoxal, ausgelöst wird.

Was der Erscheinung ihr besonderes Gepräge verleiht, ist der Umstand, daß das Methylglyoxal bemerkenswerterweise durch andere Glyoxal-abkömmlinge, z. B. Di-methyl-glyoxal (Diacetyl) sowie Phenylglyoxal, ferner durch den Stammkörper Glyoxal selbst, aber auch durch die Zucker der 3-Kohlenstoffreihe, namentlich durch Di-oxyaceton, ersetzt werden kann. Letzteres wirkt schwächer, und es ist in Betracht zu ziehen, daß erst sekundär aus der Triose hervorgehendes Methylglyoxal das tätige Agens bildet. Es wird weiterhin wahrscheinlich, daß bei den gewaltsamen Reaktionen zwischen Aminosäuren und höheren Zuckerarten in stark alkalischen oder stark sauren Lösungen intermediär gebildetes Methylglyoxal das treibende Mittel darstellt. Erwähnt sei, daß man ebenfalls mit Zucker-phosphorsäure-estern und mit Brenztraubensäure eine, wenn auch erheblich schwächere, Desaminierung erzielen kann.

Überraschend ist, daß auch Amino-purine, wie Guanin, durch Methylglxoyal unter Abspaltung von Ammoniak angegriffen werden.

In diesen Reaktionen, über die wir ausführlich berichten werden, liegen die ersten Fälle vor, bei denen ein notorisches Abbauprodukt

der Kohlenhydrate, eben das Methylglyoxal, unter biologisch beachtlichen Bedingungen und in einer für die Zellphysiologie maßgeblichen Richtung in den Umsatz der Aminosäuren und Aminosäuren-verbände sowie der Purine eingreift. Die Bedeutung der Erscheinung soll später gewürdigt werden. Sie ist zugleich wegen der unverkennbaren Bindung des Methylgloyxals an die diversen Eiweißabbauprodukte von Interesse für die Frage, wie durch enzymatische Dismutation aus den strukturell optisch-inaktiven Ketonaldehyden die verschiedenen Raumformen der entsprechenden Oxysäuren von entgegengesetztem Drehungsvermögen[1]) hervorgehen.

[1]) Vgl. *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **51**, 508, 1913; *C. Neuberg* und *M. Kobel*, ebendaselbst **182**, 470, 1927.

Berichtigungen.

In der Mitteilung von *W. Hasemann*, diese Zeitschr. **184**, 150, 1927, soll es heißen auf Zeile 16 von unten:

Nitratbakterien (statt Stickstoffbakterien).

In dieser Zeitschr. **184**, 116, 1927 lies:

Zeile 17: Lipodierese (statt Lipodiurese) und
„ 19: Lipoidodierese (statt Lipoidodiurese).

Autorenverzeichnis.

